

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MICROBIOTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO DE PRODUÇÃO CONVENCIONAL E
CERTIFICADAS COMO DE CRIAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE USO DE
ANTIMICROBIANOS**

TATIANA REGINA VIEIRA

PORTO ALEGRE

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MICROBIOTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO DE PRODUÇÃO CONVENCIONAL E
CERTIFICADAS COMO DE CRIAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE USO DE
ANTIMICROBIANOS**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de doutora em Ciências
Veterinárias, especialidade na área de bacteriologia**

Autora: Tatiana Regina Vieira

Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-orientador: Dr. Samuel Paulo Cibulski

PORTO ALEGRE

2021

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

CIP - Catalogação na Publicação

VIEIRA, TATIANA REGINA
MICROBIOTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO DE
PRODUÇÃO CONVENCIONAL E CERTIFICADAS COMO DE CRIAÇÃO
COM RESTRIÇÃO DE USO DE ANTIMICROBIANOS / TATIANA
REGINA VIEIRA. -- 2021.
180 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Coorientador: Samuel Paulo Cibulski.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Resistência a antimicrobianos. 2. Produção orgânica de Frangos. 3. Frangos Livre de antimicrobianos. 4. Beta-lactamases de espectro estendido. 5. Metagenômica. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Cibulski, Samuel Paulo, coorient.

III. Título.
Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tatiana Regina Vieira

MICROBIOTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO DE PRODUÇÃO CONVENCIONAL E CERTIFICADAS COMO DE CRIAÇÃO COM RESTRIÇÃO DE USO DE ANTIMICROBIANOS

Aprovado em 10 de fevereiro de 2021.

APROVADO POR

Profª. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e membro da Comissão avaliadora

APROVADO POR

Dr. Samuel Paulo Cibulski
Co-orientador e Membro da Comissão avaliadora

APROVADO POR

Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Membro da Comissão avaliadora

APROVADO POR

Dr. Benito Brito
Membro da Comissão avaliadora

APROVADO POR

Dra. Gertrudes Corção
Membro da Comissão avaliadora

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Marisa Cardoso, pela generosidade e paciência, por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida, de quem tenho muito orgulho de dizer que sou orientada. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Ao meu co-orientador Samuel Cibulski, por toda dedicação e carinho. Por sempre acreditar que daria certo e me mostrar o lado lindo do nosso trabalho com aqueles gráficos mirabolantes e os recadinhos quando da correção do texto que por vezes me faziam sorrir e esquecer a tensão vivida na fase final deste ciclo.

À Esther Cavinatto, estagiária de Iniciação Científica vinculada ao Projeto que esteve comigo mais de perto auxiliando nos trabalhos de bancada e descobrindo o mundo da bacteriologia. Obrigada por toda dedicação e zelo pelo nosso trabalho e nossas bactérias.

Ao professor Mauro Borba pelo apoio na aquisição de materiais e auxílio nas análises estatísticas.

À amiga e colega Marisete Cerutti pelo auxílio na aquisição de amostras. Aqui estendo o agradecimento a todos (Karolzinha, Daniel, Gustavo, Mauro, Cleverson, etc) que buscaram amostras em cada canto do Brasil onde pudesse ter um frango orgânico e/ou livre de antibióticos.

Ao Professor Celso de Oliveira e a todos os colegas do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal da Paraíba, em especial, à Núbia Michelle Vieira da Silva e Priscylla Vasconcelos que me acolheram com muito carinho, auxiliando na realização do sequenciamento para metagenômica.

À Graça e à Mainha que tornaram minha estada em Areia/Paraíba mais do que especial, obrigada por todo o cuidado e carinho.

Às Dras. Fabiana Mayer e Ana Paula Varela e a todos os colegas do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pela realização do sequenciamento das ESBL.

Ao meu amigo e colega Gustavo Sambrano por todas as conversas, incentivo e apoio não importava onde estivesse (agora na Irlanda). Pela parceria e toda dedicação nas análises do genoma da *Pseudomonas* K_25 as quais foram essenciais para a publicação do artigo de homologação desta Tese.

Aos amigos, colegas e professores do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, sem exceções, com quem desde a graduação venho aprendendo muito e que levarei sempre comigo. A pesquisadora que eu sou hoje é um reflexo de cada um de vocês. Obrigada!!!!

Aos meus amigos Daniel, Gabriela e Caroline que desde os tempos de Iniciação Científica, quando as metas eram o destaque no Salão de Iniciação Científica e não voltar para o Laboratório sem sangue me apoiaram para seguir em busca desta realização.

Às minhas amigas Lia Fukuda, Cristina Zulian e Paula Normann para as quais, mesmo depois de seis anos de formadas, ainda posso pedir socorro e desabafar.

À minha família pelo amor, carinho e compreensão.

Ao meu esposo, cuja parceria, apoio e compreensão, foram essenciais para que eu não desistisse desse sonho.

Obrigada a todos que contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

O aumento e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos é considerado um problema global de saúde pública. Entre as causas desse problema são frequentemente citados o uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos, animais de produção e agricultura. Estudos têm demonstrado os animais de produção como importantes reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos devido à pressão de seleção exercida pelo uso de antibióticos durante sua criação. Os alimentos de origem animal podem servir de veículo para microorganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos, ou mesmo para bactérias comensais portadoras de genes de resistência, os quais podem ser transmitidos para a microbiota de humanos. As soluções propostas para esse problema vão desde o banimento do uso de antimicrobianos importantes para a saúde humana com a finalidade de aditivos zootécnicos em animais até a mudança para sistemas de criação alternativos como as produções orgânica e livre de antibióticos. O impacto dessas medidas em animais de criação intensiva como o frango ainda está sendo avaliado, bem como as possíveis diferenças em termos da presença de marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos nos produtos originados de sistemas alternativos. Sendo assim, o presente estudo objetivou comparar grupos de carcaças congeladas de frango com selo de produção orgânica (GO) ou livre de antibióticos (GL) em relação àqueles de produção convencional (GC), nos seguintes aspectos: i) diferença de padrões de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* genérica isoladas a partir das carcaças; ii) presença de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL); e iii) diferença da microbiota e dos perfis de genes de resistência a antimicrobianos presentes nas carcaças. Para tanto, 24 frangos congelados embalados na indústria pertencentes a cada um dos três grupos foram adquiridos no comércio varejista, descongelados e submetidos individualmente à lavagem com água peptonada. Para avaliação do perfil fenotípico de resistência, 216 cepas de *E. coli* isoladas do líquido de lavagem foram avaliadas frente a 12 antimicrobianos. A pesquisa de *E. coli*-ESBL foi realizada por isolamento seletivo a partir do líquido de lavagem, de acordo com o protocolo elaborado pela *European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance*, seguido da avaliação do perfil fenotípico de resistência a 19 antimicrobianos nas cepas confirmadas como produtoras de ESBL. Um total de 24 cepas de *E. coli* produtoras de ESBL foram escolhidas, submetidas a sequenciamento completo do genoma e avaliadas *in silico* quanto à filogenia e a presença de genes de resistência a antimicrobianos. A caracterização da microbiota bacteriana e do metarresistoma foram realizadas por metagenômica *shotgun*, a partir do sequenciamento de alto desempenho do DNA total dos produtos de lavagem das carcaças. A resistência a pelo menos um antimicrobiano foi observada em 59,2% (128/216) do total das cepas de *E. coli* independente do grupo. As maiores frequências de resistência foram à tetraciclina (TET; 32,4%), trimetoprima (TRI; 28,2%), ampicilina (AMP; 25,0%) e ácido nalidíxico (NAL; 18,5%). Não foram detectadas cepas resistentes à colistina, meropenem e tigeciclina. Os valores de MIC₅₀ ficaram abaixo do ponto de corte clínico (CLSI, 2020) e do ponto de corte epidemiológico (ECOFF) nos três grupos de amostras. Em relação aos valores de MIC₉₀, NAL, AMP e TET apresentaram valores acima do ponto de corte clínico e epidemiológico independente do grupo. Além disso, o grupo GO apresentou MIC₉₀ acima do ponto de corte clínico para gentamicina e GL ultrapassou este ponto de corte para gentamicina e cefotaxima. A partir do modelo de regressão de Poisson verificou-se que, tomando GC como referência, houve diferença no sentido de maior ocorrência de cepas de *E. coli* totalmente suscetíveis, menor frequência de multirresistência, e menor número de cepas resistentes à ampicilina e ácido nalidíxico em GO. Em GL, apenas a menor frequência de resistentes à ampicilina em relação a GC foi demonstrada. *Escherichia coli*-ESBL foi encontrada em 39% dos frangos analisados. Oito carcaças apresentaram o perfil fenotípico ESBL/AmpC, representando 23,2% (17/73) das cepas ESBL. As maiores frequências de resistência em *E. coli*-ESBL foram detectadas frente a ácido nalidíxico, ceftiofur, cefepime,

sulfametoxazol+trimetoprim e tetraciclina. A frequência de *E. coli*-ESBL multirresistente foi de 76,7%. Todos os isolados foram suscetíveis à meropenem, ampicilina, nitrofurantoína e colistina. O resistoma das cepas *E. coli*-ESBL sequenciadas identificou a presença de 95 genes de resistência distintos. Dentre os genes que conferem resistência aos betalactâmicos, foram identificados genes codificadores de enzimas do tipo AmpC (*bla*_{CMY-2}) e ESBL (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-2A} e *bla*_{TEM-141-1}). Foram identificados 18 Tipos de Sequência (ST) e 15 sorotipos distintos nessas cepas, dentre eles ST131 e ST648, os quais são importantes patógenos para humanos. Quanto à caracterização da microbiota das amostras, não houve diferença entre os grupos em relação a abundância dos principais filos e classes presentes. O principal filo identificado foi Proteobacteria, enquanto as famílias Pseudomonadaceae, Moraxellaceae e Enterobacteriaceae foram as mais frequentes. As análises do metarresistoma demonstraram maior abundância de genes de resistência em GC. Os genes mais frequentemente identificados codificam resistência a betalactâmicos e aminoglicosídeos. Vinte e nove genes foram comuns aos três grupos, incluindo os genes que conferem resistência a betalactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas, além de genes de bombas de efluxo que podem conferir resistência a mais de uma categoria de antimicrobianos. Conclui-se que frangos congelados com selo de produção orgânica e livre de antibióticos apresentam perfis de genes de resistência, microbiota, presença de *E. coli* produtora de ESBL e prevalência de resistência fenotípica a antimicrobianos semelhantes ao encontrado em frangos de criação convencional. Entretanto, frangos com selo de produção orgânica apresentam maior prevalência de *E. coli* genérica totalmente suscetível a antimicrobianos importantes para humanos, menor prevalência de cepas multirresistentes e menor frequência de cepas resistentes à ampicilina e ácido nalidíxico do que frangos de produção convencional. De forma similar, a abundância de genes de resistência presentes em frangos congelados de produção orgânica é menor do que a encontrada em frangos de produção convencional. Essas observações indicam que há menor pressão de seleção de resistência a antimicrobianos nos sistemas de produção orgânica e que esse fato tem reflexo no produto ofertado ao consumidor.

Palavras-chave: frango de produção orgânica, frango de produção livre de antimicrobianos, resistência a antimicrobianos, beta-lactamases de espectro estendido, metarresistoma; metagenômica

ABSTRACT

The increase and dissemination of antimicrobial resistant bacteria is considered a global public health problem. Among their causes the indiscriminate use of antimicrobials in humans, animal production and agriculture are often cited. Studies have pointed out food-animals as important reservoirs of bacteria resistant to antimicrobials caused by the selection pressure exerted by the use of antibiotics during their rearing. Meat and other foods of animal origin, in turn, can be a vehicle for pathogenic or commensal microorganisms that, in this way, can reach the consumer, disseminating resistance genes in the human microbiota. The proposed solutions to this problem can range from banning the use of antimicrobials important for human health in animals, to the adoption of alternative farming systems such as organic production. The impact of these measures on intensive reared livestock, such as poultry, as well as the differences in terms of the presence of phenotypic and genotypic markers of antimicrobial resistance in products originating from alternative systems have been studied. Thus, the present study aimed at comparing groups of frozen chicken carcasses certificated as from organic production (GO) or antibiotic-free production (GL) with those of conventional production (GC), in the following aspects: i) difference in antimicrobial resistance patterns of generic E. coli isolated from carcasses; ii) presence of extended-spectrum β -lactamase producing bacteria (ESBL); and iii) difference in the microbiota and profiles of antimicrobial resistance genes present in the carcasses. For this purpose, 24 frozen chicken packaged in the industry belonging to each of the three groups were purchased in supermarkets, thawed and subjected to individual peptone water rinsing. For the determination of the phenotypic resistance profile of E. coli, 216 strains isolated from the rinsing liquid were evaluated against 12 antimicrobials according to CLSI/2020 and EUCAST. The E. coli-ESBL survey was carried out by selective isolation, according to the protocol elaborated by the European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance, followed by the evaluation of the phenotypic resistance profile to 19 antimicrobials in the strains confirmed as ESBL-producers. A total of 23 strains of ESBL-producer E. coli were chosen, subjected to genomic sequencing and analyzed for the presence of antimicrobial resistance genes and phylogenetics. The characterization of the bacterial microbiota and the metarresistoma were carried out by sequencing the DNA obtained from pooled rinse-fluids of carcasses from each group, using the shotgun approach. Resistance to at least one antimicrobial was observed in 59.2% (128/216) of E. coli strains regardless of the group. The highest frequencies of resistant strains were reported to tetracycline (TET; 32.4%), trimethoprim (TRI; 28.2%), ampicillin (AMP; 25.0%) and nalidixic acid (NAL; 18.5%). Strains resistant to colistin, meropenem and tigecycline were not detected. The MIC₅₀ was below both the clinical cutoff point (CLSI, 2020) and the epidemiological cutoff point (ECOFF) in E. coli strains belonging to the three sample groups. Regarding the MIC₉₀, NAL, AMP and TET presented values above the clinical and epidemiological cutoff point regardless of the group. In addition, the GO group presented MIC₉₀ above the clinical cutoff point for gentamicin and GL exceeded this cutoff point for gentamicin and cefotaxime (GL). The Poisson regression model, using GC as the reference, showed a higher frequency fully susceptible, and lower frequency of multidrug resistance, and fewer strains resistant to ampicillin and nalidixic acid. in E. coli strains from GO. In GL, only the lowest frequency of ampicillin resistant compared to GC was demonstrated. ESBL-producer E. coli was found in 39% of the chickens analyzed. Eight carcasses showed the ESBL/pAmpC phenotypic profile, accounting for 23.2% (17/73) of the ESBL-producer strains. The highest frequencies of resistance in E. coli-ESBL were detected against nalidixic acid, ceftiofur, cefepime, sulfamethoxazole + trimethoprim and tetracycline.

The frequency of multidrug-resistant *E. coli*-ESBL was 76.7%. All isolates were susceptible to meropenem, amikacin, nitrofurantoin and colistin. The resistome of the sequenced *E. coli*-ESBL strains identified the presence of 95 distinct resistance genes. Among the genes that confer resistance to beta-lactams, genes encoding enzymes of the AmpC-type (*bla*_{CMY-2}) and ESBL (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-2A} and *bla*_{TEM-141-1}) were found. Eighteen Sequence Types (ST) and 15 distinct serotypes were identified in these strains, among them ST131 and ST648, which are important pathogens for humans. As for the characterization of microbiota, there was no difference between groups regarding the abundance of the main phyla and classes present. The main phylum identified was Proteobacteria, while the families Pseudomonadaceae, Moraxellaceae and Enterobacteriaceae were the most frequent. The analysis of the metarresistoma demonstrated a greater abundance of resistance genes in GC. The most frequently identified genes code for resistance to beta-lactams and aminoglycosides. Twenty-nine genes were common to the three groups, including genes that confer resistance to beta-lactams, aminoglycosides and tetracyclines, as well as efflux pump genes that can confer resistance to more than one category of antimicrobials. It is concluded that frozen chickens with certification of organic production or free of antibiotics have profiles of resistance genes, microbiota, presence of ESBL-producing *E. coli* and prevalence of phenotypic resistance to antimicrobials similar to that found in conventionally reared chickens. However, chickens certificated as from organic production have a higher prevalence of generic *E. coli* that is full susceptible to important antimicrobials for humans, less prevalence of multidrug-resistant strains and less frequency of strains resistant to ampicillin and nalidixic acid than conventionally produced chickens. Similarly, the abundance of resistance genes present in frozen organic chickens is lower than that found in conventionally produced chickens. These observations indicate that there may be less pressure to select resistance to antimicrobials in organic production systems and that this fact has impact in the product offered to the consumer.

Keywords: organic chicken production, antibiotic-free chicken, antimicrobial resistance, extended-spectrum β -lactamase, meta-resistome, meta-genomic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Apresentação da frequência relativa da soma das cepas resistentes a cada antimicrobiano, das cepas multirresistentes (MDR) e das cepas totalmente suscetíveis (Tsus). 74
- Figura 2** – Distribuição das cepas resistentes de *E. coli*, por grupo de produção e antimicrobiano. São apresentadas também as distribuições das cepas multirresistentes e totalmente suscetíveis de acordo com o grupo de produção. 75
- Figura 3** – Frequência relativa de cepas resistentes aos antimicrobianos, bem como, de cepas multirresistentes e totalmente suscetíveis por grupo de produção. 76
- Figura 4** – Teste de sinergia de disco duplo positivo. Placas contendo ágar Müller Hinton e inóculos bacterianos após 18-20h de incubação à 36 ± 1 °C. (A) é apresentado o teste com disco de ácido clavulânico ao centro. (B) é apresentado o teste com disco de cloxacilina ao centro. Ambos apresentam cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ) nas extremidades. A positividade do teste pode ser verificada pelo aumento dos halos de inibição em direção aos discos centrais nas duas placas. 80
- Figura 5** – Distribuição (números absolutos) da frequência de resistência em cepas produtoras de ESBLs considerando os 19 antimicrobianos testados. 81
- Figura 6** – Análise filogenética gerada automaticamente pela plataforma <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/> utilizando a cepa referência *E. coli* K-12 (GenBank PRJNA225). As letras a direita indicam classificação filogenética de acordo com Clermont. 83
- Figura 7** – Distribuição dos plasmídeos detectados pelo PlasmidFinder por bactéria. 84
- Figura 8** – Distribuição dos genes de resistência mapeados pelo CARD conforme mecanismo de resistência. 85
- Figura 9** – Distribuição dos genes de resistência conforme classe de antimicrobianos 85
- Figura 10** – Frequência de genes codificadores de enzimas ESBL e pAmpC identificados em plasmídeos. 86
- Figura 11** – Percentual da distribuição dos genes de resistência bacteriana, por categoria, detectados em todos os grupos de produção conforme a categoria ou mecanismo de resistência. 92
- Figura 12** – Frequência relativa de resistência às dez classes bacterianas mais frequentes em cada sistema de produção. 93

| | |
|---|-----|
| Figura 13 – Abundância geral (FPKM) de genes de resistência por subpopulação (<i>pool</i>). Boxplots: uma caixa representa o percentil 25 (Q1) a 75 (Q3), a linha central representa a mediana (Q2)..... | 94 |
| Figura 14 – Abundância de genes de resistência por grupo de produção, distribuídos conforme categoria de antimicrobianos..... | 95 |
| Figura 15 – Coreresistoma. São apresentados os genes de resistência a antimicrobianos detectados, concomitantemente, nos três grupos de produção. As barras representam a abundância de cada gene (FPKM) por grupo. | 96 |
| Figura 16 – Distribuição das principais classes de MGEs detectadas por grupo de produção. | 99 |
| Figura 17 – Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de MGEs entre os diferentes grupos de produção..... | 101 |
| Figura 18 – Diagrama de Sankey gerado pelo Pavian apresentando a distribuição e abundância taxonômica bacteriana nos três grupos de produção GC, GL e GO..... | 103 |
| Figura 19 – Abundância relativa dos filos bacterianos identificados em cada grupo de produção. | 106 |
| Figura 20 – Abundância relativa das classes bacterianas por grupo de produção..... | 107 |
| Figura 21 – Abundância relativa das famílias bacterianas por grupo de produção. | 108 |
| Figura 22 – Abundância relativa dos gêneros bacterianos por grupo de produção. | 109 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais quinolonas e fluoroquinolonas e seu espectro de ação..... | 38 |
| Tabela 2 - Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações utilizadas e valores de ECOFF e de <i>breakpoint</i> de resistência. | 58 |
| Tabela 3 - Antimicrobianos testados por disco difusão, concentrações utilizadas e valores de ECOFF e de <i>breakpoint</i> de resistência. | 59 |
| Tabela 4 - Antimicrobianos testados por disco difusão para o teste presuntivo da presença de ESBL e carbapenemases, concentrações utilizadas e valores de ponto de corte de triagem..... | 61 |
| Tabela 5 - Lista dos antimicrobianos testados apresentando as categorias e concentrações. | 63 |
| Tabela 6 - Comparação da enumeração de <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais entre os sistemas de produção. Os dados estão apresentados por mediana, mínimo e máximo..... | 70 |
| Tabela 7 - Número de carcaças positivas para <i>E. coli</i> em cada grupo de produção..... | 70 |
| Tabela 8 - Distribuição das cepas de <i>E. coli</i> (número absoluto) frente ao teste de Concentração Inibitória Mínima conforme antimicrobiano, concentrações testadas e grupo de amostras de frango congelado. | 71 |
| Tabela 9 - Distribuição das cepas resistentes em grupos de amostras de frango congelado de acordo com o número de categorias de antimicrobiano em que houve resistência | 73 |
| Tabela 10 - Médias de antimicrobianos resistentes por isolado por produção. Os dados estão apresentados por média, mínimo e máximo..... | 75 |
| Tabela 11 - Frequência relativa por suscetibilidade | 77 |
| Tabela 12 - Resultados obtidos a partir do modelo de regressão de Poisson | 78 |
| Tabela 13 - Distribuição de carcaças presuntivas positivas e confirmadas para ESBL conforme sistema de produção. | 79 |
| Tabela 14 - Distribuição de cepas ESBL resistentes conforme o número de categorias antibacterianas..... | 82 |
| Tabela 15 - Distribuição das cepas de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL conforme o grupo filogenético..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 16 - Panorama geral com os dados compilados das 23 cepas de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL sequenciadas. | 87 |
| Tabela 17 - Total de <i>reads</i> geradas em cada rodada de sequenciamento por agrupamento das amostras conforme o sistema de produção. | 90 |
| Tabela 18 - Total de <i>reads</i> alinhadas frente ao genoma referência do hospedeiro (<i>Gallus gallus</i> - galGal4). | 91 |
| Tabela 19 - Diversidade de genes de resistência conforme índices de Shannon e Simpson calculados por pool de sequenciamento. | 93 |
| Tabela 20 - Distribuição das leituras normalizadas dos genes de resistência. Os dados estão apresentados por mediana, mínimo e máximo. | 94 |
| Tabela 21 - Genes de resistência a antimicrobianos detectados, exclusivamente, em cada grupo de produção. | 96 |
| Tabela 22 - Distribuição das leituras normalizadas de MGEs. Os dados estão apresentados por mediana e amplitude interquartil (percentis 25 - 75). | 99 |
| Tabela 23 - Genes de MGEs identificados, concomitantemente, nos três grupos de produção. | 100 |
| Tabela 24 - Diversidade de MGEs conforme índices de Shannon e Simpson calculados por pool de sequenciamento. | 102 |
| Tabela 25 - Distribuição absoluta das leituras da classificação de gêneros. Os dados estão apresentados por mediana e amplitude interquartil (percentis 25 - 75). | 109 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 | Avicultura no Brasil e a importância da carne de frango | 20 |
| 2.2 | Uso de antimicrobianos na produção animal..... | 21 |
| 2.2.1 | Ações/iniciativas para a redução do uso de antimicrobianos em medicina veterinária | 25 |
| 2.3 | Resistência a antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> | 27 |
| 2.3.1 | Mecanismos de resistência aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados na produção animal e/ou criticamente importantes para saúde humana | 28 |
| 2.3.1.1 | Resistência a aminoglicosídeos | 28 |
| 2.3.1.2 | Resistência a betalactâmicos | 30 |
| 2.3.1.3 | Resistência às polimixinas..... | 34 |
| 2.3.1.4 | Resistência às quinolonas | 37 |
| 2.3.1.5 | Resistência às tetraciclinas | 40 |
| 2.4 | Resistência em <i>E. coli</i> e o uso de antimicrobianos na produção animal | 41 |
| 2.5 | Transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos de animais para humanos | 45 |
| 2.6 | Sistemas de produção “alternativos” | 47 |
| 2.6.1 | Sistemas de produção “alternativos” e resistência antimicrobiana | 50 |
| 2.7 | Metagenômica | 52 |
| 3 | OBJETIVOS | 54 |
| 3.1 | Geral | 54 |
| 3.2 | Específicos | 54 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 55 |
| 4.1 | Delineamento do estudo | 55 |
| 4.2 | Processamento das amostras de frango congelado..... | 56 |
| 4.3 | Enumeração de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>..... | 56 |
| 4.4 | <i>Escherichia coli</i> como indicador de resistência a antimicrobianos..... | 57 |
| 4.4.1 | Formação do grupo de isolados de <i>E. coli</i> provenientes de frangos congelados de GC, GL e GO | 57 |
| 4.4.2 | Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>E. coli</i> | 57 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.5 | Pesquisa de <i>E. coli</i> produtora de beta-lactamases de espectro estendido - ESBL | 60 |
| 4.5.1 | Teste presuntivo para a pesquisa de bactérias produtoras de ESBL | 60 |
| 4.5.2 | Teste fenotípico para a confirmação de bactérias produtoras de ESBL | 61 |
| 4.5.3 | Determinação do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos em <i>E. coli</i> produtora de ESBL | 62 |
| 4.6 | Avaliação do perfil genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de <i>E. coli</i> produtores de ESBL | 63 |
| 4.6.1 | Seleção dos isolados para caracterização genômica | 63 |
| 4.6.2 | Extração de DNA | 64 |
| 4.6.3 | Sequenciamento do genoma total de <i>E. coli</i> | 64 |
| 4.6.4 | Montagem, anotação e pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos | 64 |
| 4.7 | Avaliação da população e de genes de resistência a antimicrobianos em lavados de carcaças de frangos – Metagenômica e Metarresistoma | 65 |
| 4.7.1 | Extração de DNA | 65 |
| 4.7.2 | Sequenciamento de alto desempenho | 66 |
| 4.7.3 | Análise da qualidade das sequências e montagem do metagenoma | 67 |
| 4.7.4 | Filtragem das sequências relacionadas ao hospedeiro | 67 |
| 4.7.5 | Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos e elementos genéticos móveis (metarresistoma e mobiloma) | 67 |
| 4.7.6 | Caracterização da comunidade bacteriana encontrada nos lavados | 68 |
| 5 | RESULTADOS | 69 |
| 5.1 | Caracterização das amostras e enumeração de <i>E. coli</i> e coliformes totais | 69 |
| 5.2 | <i>Escherichia coli</i> como indicador de resistência a antibacterianos | 70 |
| 5.3 | Pesquisa de <i>E. coli</i> produtora de ESBL | 78 |
| 5.3.1 | Avaliação do perfil genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de <i>E. coli</i> produtores de ESBL | 82 |
| 5.4 | Metarresistoma e metagenômica | 90 |
| 5.4.1 | Sequenciamento de alto desempenho (processamento das sequências) | 90 |
| 5.4.2 | Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos | 91 |
| 5.4.2.1 | Corerresistoma | 95 |
| 5.4.3 | Pesquisa de elementos genéticos móveis (MGEs) | 98 |
| 5.4.4 | Caracterização da comunidade bacteriana identificada nos lavados | 102 |
| 6 | DISCUSSÃO | 110 |

| | | |
|----------|--------------------------|------------|
| 7 | CONCLUSÃO | 133 |
| | REFERÊNCIAS | 134 |
| | ANEXO I..... | 161 |
| | APÊNDICE A | 162 |
| | APÊNDICE B | 164 |
| | APÊNDICE C | 165 |
| | APÊNDICE D | 166 |
| | APÊNDICE E | 170 |
| | APÊNDICE F..... | 176 |

1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos tem sido pauta frequente de discussões das principais organizações internacionais envolvidas na defesa da saúde humana e animal. Dentre os fatores implicados no surgimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes, os sistemas de produção animal são frequentemente citados como uma das principais fontes dessas bactérias. Esse fator seria decorrente do uso de milhares de toneladas de princípios antibacterianos, tanto como promotores de crescimento quanto para profilaxia e tratamento terapêutico dos animais mantendo, assim, os índices de produtividade.

No cenário mundial, a carne de frango destaca-se como a principal fonte de proteína animal, cujo consumo atingiu mais de 98 milhões de toneladas no ano de 2019. Apesar de existir consenso científico de que o sucesso da produção é devido, principalmente, a décadas de melhoramento genético, nutrição, vacinas, novas tecnologias e de adequações no manejo sanitário das criações, o uso de antimicrobianos não pode ser ignorado como um dos fatores que fizeram a avicultura industrial mundial chegar aos patamares de produção conhecidos hoje.

Contudo, o uso de antimicrobianos em animais de produção tem suas ressalvas considerando a disseminação de bactérias resistentes. Estudos têm demonstrado a presença de genes de resistência em bactérias isoladas em diversos elos da cadeia de produção de proteína animal, sugerindo, inclusive, um grande potencial de transferência horizontal desses genes. Além disso, discute-se o papel dos animais como reservatórios desses micro-organismos. Considerando que a carne desses animais é destinada ao consumo humano, cogita-se a possibilidade dessas bactérias, portadoras de genes de resistência, serem incorporadas também à microbiota e ambiente humano.

Entre os micro-organismos resistentes importantes em saúde pública destacam-se as bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). As ESBLs desempenham um papel importante em saúde pública uma vez que o tratamento de infecções causadas por essas bactérias é limitado. Animais destinados à produção de alimentos, especialmente frangos, têm sido considerados um importante reservatório de bactérias produtoras de beta-lactamases (DAME-KOREVAAR et al., 2019; PROJAHN et al., 2018).

A preocupação com a transmissão desses micro-organismos fez com que muitos países criassem mecanismos de controle do uso de antimicrobianos na produção animal, com a proposta de completo banimento em alguns deles. Exemplo disso, é a União Europeia que desde 2006 vedou o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento na produção animal. Nesse contexto, muitos países exportadores de carne de frango, como o Brasil, têm

buscado se adequar às exigências desses mercados visando à redução do uso de antimicrobianos em toda a cadeia de produção.

Contudo, apesar das evidências de que o uso desses antimicrobianos em grande escala, como aditivos zootécnicos, tenha selecionado populações resistentes e essas tenham sido disseminadas, não é unanimidade que o simples fato da retirada dessas drogas seja suficiente para que essas populações sejam reduzidas ou extintas. Sendo assim, a realização de pesquisas que monitorem esses dados pode balizar novas estratégias de controle e estabelecer se aquelas já existentes são suficientes para a redução de populações bacterianas resistentes, principalmente no que se refere aos antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana.

A melhoria da capacidade de vigilância da resistência é considerada como uma das estratégias necessárias para mitigar o desenvolvimento de patógenos resistentes a antimicrobianos em nível mundial. Além disso, instituições governamentais e indústria têm buscado alternativas para reduzir o uso de antimicrobianos nos sistemas de produção animal a fim de barrar o aumento da resistência bacteriana atrelada a esses sistemas além de atender as demandas do mercado internacional.

Entre essas alternativas, produtores têm optado por sistemas alternativos de criação, como a orgânica, que tem, entre outras premissas, a restrição no uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. Além dessa, têm surgido sistemas de produção nos quais não é admitido o uso de antimicrobianos em nenhuma hipótese, como é o caso das produções livres de antimicrobianos, também exploradas no país.

Para Crandall et al. (2009), a percepção básica do consumidor frente aos alimentos provenientes de “sistemas alternativos”, a exemplo dos orgânicos, é de que esses alimentos são inerentemente mais seguros do que os convencionais; no entanto, sua compreensão dos riscos de micro-organismos patogênicos nesses alimentos não é clara. Tal percepção pode colocar os consumidores desses produtos em risco, uma vez que podem reduzir os cuidados na utilização e consumo desses alimentos, principalmente de carnes. Assim, a veiculação de patógenos alimentares ou micro-organismos comensais resistentes aos antimicrobianos por meio de produtos oriundos de sistemas alternativos de produção de alimentos de origem animal não pode ser negligenciado.

Sendo assim, e considerando:

- a) o grande consumo da carne de frango no mundo e no Brasil;
- b) a importância dessa *commodity* no comércio mundial;

- c) o uso de aditivos alimentares à base de antimicrobianos na exploração convencional de frango;
- d) que a cadeia de produção animal poderia contribuir para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos utilizados em saúde humana e essa disseminação deve ser monitorada;
- e) que a disponibilidade de dados de resistência em *E. coli* isoladas de frangos ainda é escassa no Brasil (ROTH et al., 2019b);
- f) que a presença de bactérias produtoras de ESBLs em alimentos destinados ao consumo humano é uma questão de saúde pública;
- g) que produtos de sistemas alternativos são vistos pelos consumidores como mais seguros do que os convencionais, no entanto, faltam evidências científicas para comprovar tal percepção.

O presente estudo teve como objetivos: i) investigar a diferença de padrões de resistência a antimicrobianos de *E. coli* isoladas de carcaças congeladas de frango provenientes de sistemas de produção convencionais e de sistemas certificados como de criação com restrição de uso de antimicrobianos; ii) pesquisar a presença de bactérias produtoras de ESBL na matriz em estudo; e iii) verificar a diferença da microbiota e dos perfis de genes de resistência a antimicrobianos presentes nessas carcaças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Avicultura no Brasil e a importância da carne de frango

A criação de frangos no Brasil, como tantas outras culturas agropecuárias, teve sua origem baseada na cultura de subsistência. Inicialmente, era considerada uma proteína cara, inclusive se comparada à carne bovina, sendo comercializada viva devido ao receio do consumo de aves doentes frente à falta de controle sanitário (COSTA, 2011). Somente no final da década de 50, com a introdução de novas raças e a melhoria das condições técnicas de produção, foram dados os primeiros passos em direção à industrialização da avicultura no país (COSTA, 2011). Ainda assim, apenas 20 anos depois seu desenvolvimento foi efetivado com a inserção de empresas especializadas no processo de produção e a implantação dos sistemas de integração vertical, nos quais indústria e avicultor têm papéis específicos na produção (ZEN et al., 2015).

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2020), a produção de carne de frango no Brasil chegou a 13,24 milhões de toneladas em 2019. Nesse ano, o Brasil foi responsável por 13,8% da produção mundial, abaixo apenas dos Estados Unidos (EUA) e China. Trinta e dois por cento dessa produção foi exportada, mantendo o país como maior exportador de carne de frango e terceiro maior produtor desta proteína animal no mundo.

Dados da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD) revelam que o consumo mundial de carne de aves alcançou 14,7 kg per capita no ano de 2019. A população dos maiores produtores de carne de aves do mundo, EUA e Brasil, consumiram 50,1 e 42,84 Kg/hab/ano, respectivamente, muito acima do percentual mundial (ABPA, 2020; OECD, 2020).

A carne de frango passou a ser, em 2019, a principal fonte de proteína animal consumida no mundo (OECD, 2020), sendo considerada um dos alimentos de maior valor nutritivo à disposição da população. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) tem alertado o mundo sobre os problemas de fome e desnutrição, chamando atenção para a necessidade do aumento na produção de alimentos. O baixo custo, comparado a outras proteínas de origem animal, o valor nutritivo e a inexistência de restrições religiosas fazem da carne de frango uma importante fonte alimentar para atender tal demanda (COSTA, 2011). Aliado a isso, se comparada a outras produções como as de carne bovina e suína, a produção de carne de frango é a que tem menor impacto ambiental devido a sua eficiência na conversão alimentar o que significa redução no consumo de ração e, conseqüentemente, produção de resíduos (GERBER; OPIO; STEINFELD, 2007). Contudo, o uso de antimicrobianos em grande

escala, principalmente como melhoradores de desempenho, pode vir a ser um entrave para a produção mundial frente aos desafios para reduzir a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

2.2 Uso de antimicrobianos na produção animal

O uso de antimicrobianos tem sido uma ferramenta essencial para o controle e prevenção de doenças nos sistemas de produção animal, principalmente em sistemas intensivos, a exemplo da criação de aves, marcados pela pressão de infecção devido ao elevado número de animais alojados. Sendo assim, os antimicrobianos podem ser usados em diferentes dosagens e períodos conforme o seu objetivo final (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

O uso terapêutico ou curativo, amplamente conhecido em saúde humana e animal, é a forma na qual o princípio ativo é administrado em um número relativamente pequeno de animais por um curto período de tempo. Nesse caso, a finalidade é eliminar ou inibir o crescimento de um micro-organismo já instalado que está causando uma enfermidade (MARSHALL; LEVY, 2011).

Antimicrobianos podem ser administrados, também, para controlar a propagação de uma doença em face de um surto. Diferente do tratamento terapêutico, no uso metafilático nem todos os animais que recebem o medicamento estariam doentes ou apresentariam sinal clínico. No entanto, devido à proximidade e tipo de produção (intensiva), com potencial para disseminação rápida da doença, todos recebem o medicamento (NGUYEN et al., 2016).

O uso de antimicrobianos de forma profilática (preventiva) é utilizada para evitar o início de uma doença. Geralmente realizada em períodos em que se sabe que vai ocorrer algum estresse ou que os animais podem estar em risco. Nesses casos, a administração é realizada em todos os animais antes mesmo do surgimento de sinais clínicos que indiquem a ocorrência de enfermidades (CHAPMAN, 2009; CUPERUS et al., 2016).

Por fim, os antimicrobianos podem ser administrados como promotores de crescimento, também denominados melhoradores de desempenho. Administrados diariamente nas rações, em doses subterapêuticas, têm a função de promover o crescimento, potencializando os efeitos nutricionais da dieta e aumentando a disponibilidade dos nutrientes para os animais (REIS et al., 2014). O uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho em rações para animais foi permitido nos países membros da União Europeia durante 50 anos (CASTANON, 2007) e seus efeitos benéficos para a transformação de carne de frango são conhecidos desde 1946 (DIAZ-SANCHEZ et al., 2015). Porém, tal prática tem sido vista como um impulsionador

para seleção e manutenção de populações bacterianas resistentes aos princípios ativos administrados (KIRCHHELLE, 2018).

Embora dados oficiais quanto ao volume de antimicrobianos utilizados na produção animal ainda sejam escassos (ROTH et al., 2019b), estudos realizados a partir do volume de vendas estimam que mais de 60% da produção mundial de antimicrobianos seja destinada à produção animal e que três quartos desse volume não seriam utilizados no tratamento de doenças, mas sim, como aditivos zootécnicos nas rações (AGYARE et al., 2018; VAN BOECKEL et al., 2014, 2015).

Segundo dados da *European Medicine Agency* (EMA), em 2016, foram comercializadas mais de 7,7 mil toneladas de princípios antibacterianos para administração em animais de produção de alimentos. Desde o início do levantamento, em 2011, a agência europeia tem verificado redução na venda global de antimicrobianos para animais. Contudo, em 2018 ainda foram comercializadas mais de seis mil toneladas de antimicrobianos para uso em animais entre os 31 países europeus participantes do levantamento (EUROPEAN MEDICINES AGENCY; EUROPEAN SURVEILLANCE OF VETERINARY ANTIMICROBIAL CONSUMPTION, 2020).

Ainda quanto ao consumo de antimicrobianos em medicina animal, alguns países contam com programas de monitoramento do consumo desses medicamentos. No Japão, Hosoi et al. (2014), utilizando dados do Ministério da Agricultura, Florestas e Pesca, mostraram uma relação do consumo de antimicrobiano terapêutico por produção de biomassa, entre os anos de 2005 e 2010, nos animais de criação. Nesse estudo, o maior uso foi observado em suínos (392 a 423 mg/kg), seguido por gado de corte (45 a 67 mg/kg), frangos de corte (44 a 63 mg/kg) e gado leiteiro (33 a 49 mg/kg).

Uma abordagem diferente é utilizada no levantamento do uso de antimicrobianos na produção animal em países da Europa, onde a PCU (Unidade de Correção Populacional) é utilizada ao invés da biomassa. Nesses países a venda de antimicrobianos também foi maior para a indústria de suínos (32%) e bovinos (31%), seguida pela indústria de frangos (14%) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY; EUROPEAN SURVEILLANCE OF VETERINARY ANTIMICROBIAL CONSUMPTION, 2018).

Na África, onde não existem programas de vigilância da resistência bacteriana em animais ou documentação do uso de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, o uso de antimicrobianos na produção animal varia de 77,6% a 100% conforme o país estudado (KIMERA et al., 2020).

No Brasil, os dados disponíveis no Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) são apresentados em faturamento (R\$), o que pode não condizer, necessariamente, com o uso no período. Segundo o Sindicato, o faturamento líquido na indústria veterinária foi de 6,5 bilhões de reais em 2019. Deste montante, produtos para aves contribuíram em 13% no faturamento total ocupando o terceiro lugar de vendas, abaixo dos medicamentos vendidos para administração em ruminantes (52%) e em cães e gatos (22%). Quanto às classes terapêuticas, os antimicrobianos foram responsáveis por 14% do faturamento das indústrias de produtos para saúde animal, em 2019. O país está na fase de implantação de seu sistema de coleta de informações de antimicrobianos – SCIA (<https://sistemas.sindan.org.br/scia/>) como uma das ações do Plano de Ação Nacional de Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos.

No Canadá, o Programa Integrado Canadense de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (CIPARS), implementado em 2013, monitora as tendências no uso de antimicrobianos e a resistência antimicrobiana em espécies bacterianas isoladas de fontes humanas, animais e alimentares. O último relatório disponível (2018) apontou aumento de cinco por cento na quantidade de antimicrobianos distribuídos no país para uso em animais (GOVERNMENT OF CANADA, 2020). Agunos et al. (2017), ao descreverem o uso de antimicrobianos em frangos de corte entre 2013 e 2015, verificaram uma redução no uso dos mesmos. Os coccidiostáticos foram a classe antimicrobiana mais utilizada (53% do total em kg). Excluindo os coccidiostáticos, os três antimicrobianos mais frequentemente utilizados foram bacitracina (53% dos rebanhos), virginiamicina (25%) e avilamicina (21%). Os autores chamam atenção para o fato de que mais da metade (59%) dos antimicrobianos utilizados em frangos de corte nas granjas canadenses foram em classes não utilizadas em medicina humana.

Os grupos de antimicrobianos mais comumente utilizados no tratamento de aves doentes são os betalactâmicos, polipeptídeos, aminoglicosídeos e aminociclitolis, macrolídeos e lincosamidas, florfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas e ionóforos (HOFACRE; FRICKE; INGLIS, 2013; LANDONI; ALBARELLOS, 2015). Em levantamento realizado no Paraná (PAMVET-PR, 2005), alguns desses grupos farmacológicos também foram citados tendo, no entanto, aplicações preferenciais. Os grupos mais utilizados com propósito preventivo na fase de desenvolvimento final da produção do frango de corte foram: fluoroquinolonas (34%), ionóforos (20%) e macrolídeos (10%), seguidos de quinolonas e tetraciclina (6%). Já para o tratamento de doença diagnosticada (uso terapêutico), os antimicrobianos mais citados foram ionóforos (25%), fluoroquinolonas (19%), sulfonamidas (14%), tetraciclina (11%), betalactâmicos (7%), macrolídeos (5%) e aminoglicosídeos (4%).

Levantamentos como esse são escassos no Brasil e, considerando as prováveis diferenças entre as produções em todo o território brasileiro, não é possível extrapolar tal informação para o restante do país.

Mesmo em países onde o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento não é permitido, o volume dessas drogas na produção animal ainda pode ser significativo. Na Tailândia (WONGSUVAN et al., 2018), onde a produção de aves não envolve o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, o uso de antimicrobianos pode chegar a 161 toneladas por ano, sendo observado o uso frequente de amoxicilina, colistina, oxitetraciclina e tilmicosina. Diante dos resultados, os autores sugerem a discriminação do uso de antimicrobianos nos rótulos dos produtos de aves comercializadas no país.

Em 2016, os princípios ativos mais frequentemente utilizados na produção animal em 30 países da Europa foram tetraciclina (32%), penicilinas (26%) e sulfonamidas (12%). No geral, essas três classes representaram 70% das vendas totais nos 30 países (EUROPEAN MEDICINES AGENCY; EUROPEAN SURVEILLANCE OF VETERINARY ANTIMICROBIAL CONSUMPTION, 2018). Nos Estados Unidos, tetraciclina representa dois terços dos antimicrobianos administrados em animais (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2018). As tetraciclina (46% a 51%) também foram as mais vendidas para uso terapêutico em animais de produção no Japão entre os anos de 2005 a 2010, seguidas das sulfonamidas (14% a 18%) e penicilinas (8% a 11%) (HOSOI et al., 2014).

Alguns dos levantamentos mencionados anteriormente fazem parte dos programas de vigilância no uso de antimicrobianos nos referidos países, preconizados pelo plano de ação global sobre resistência a antimicrobianos. Este Plano é um movimento mundial que tem como objetivo enfrentar o surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana.

Adotado pelos países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS), da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) em 2015, o plano foi endossado por líderes políticos em 2016, sendo firmado o compromisso de implementá-lo nos níveis global, regional e nacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Há variação significativa no cumprimento das metas por parte dos países membros, com países apresentando planos nacionais ainda em desenvolvimento, enquanto outros com seus planos implementados e o monitoramento sendo efetivamente realizado. Apesar do foco principal para a redução no uso de antimicrobianos na produção animal estar voltado, principalmente, ao uso desses princípios ativos como melhoradores zootécnicos, a administração de substâncias antimicrobianas para o tratamento

de doenças em sistemas de produção intensiva é uma realidade em todo o mundo, visto o volume de antimicrobianos contabilizados mesmo em países cuja prática do uso de aditivos não é realizada. Além disso, muitas vezes os programas de monitoramento não são capazes de determinar quanto do volume de antimicrobianos foi efetivamente utilizado como melhorador de desempenho, dificultando a correlação entre a forma de uso e o surgimento ou manutenção de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

2.2.1 Ações/iniciativas para a redução do uso de antimicrobianos em medicina veterinária

O uso de antimicrobianos em grande escala em animais destinados a alimentação humana tem sido foco de debates e pesquisas em função da possibilidade de seleção e disseminação de bactérias resistentes; com isso, ao longo do tempo, alguns princípios ativos tiveram seu uso descontinuado na produção animal. Iniciativas para a redução no uso de antimicrobianos tiveram início em 1986, quando a Suécia proibiu o uso desses compostos como promotores de crescimento e, dois anos depois, proibiu sua utilização de forma profilática.

A partir desses eventos, a proibição do uso de melhoradores de desempenho com ação antibacteriana ocorreu na Dinamarca, Reino Unido e União Europeia (AGYARE et al., 2018). Segundo More (2020), novos regulamentos sobre medicamentos veterinários e alimentos medicamentosos ainda irão influenciar substancialmente a prescrição e uso de antimicrobianos em toda a Europa no futuro.

Os Estados Unidos iniciaram, em 2013, o processo de redução do uso de antimicrobianos a partir da elaboração de um guia (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013) voltado às indústrias farmacêuticas, no qual é abordada a necessidade do uso prudente de antimicrobianos e faz recomendações quanto à limitação do uso de medicamentos antimicrobianos importantes para garantir a saúde humana. Assim, em 2017, a indústria farmacêutica americana, após análise em conjunto com o FDA, revisou, voluntariamente, a bula de diversos antimicrobianos no sentido de remover o uso como promotores de crescimento daqueles considerados criticamente importantes para a medicina humana. Apesar do movimento para a redução do uso de antimicrobianos importantes para a saúde humana, em animais no país, o período de 2017 a 2018 ainda foi marcado por aumento de nove por cento nas vendas internas e distribuição desses antimicrobianos destinados a animais produtores de alimentos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2019).

A tendência é que outros países sigam essa linha, restringindo inicialmente a utilização de princípios ativos considerados criticamente importantes para a saúde humana até o completo banimento dos antimicrobianos como aditivos zootécnicos. No Brasil, desde 2009, tetraciclina, anfenicóis, betalactâmicos, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são vedadas para utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais - Instrução Normativa 26/2009 10/07/2009 (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009). São proibidas, ainda, no país para uso como promotores de crescimento as substâncias: avoparcina (Of. Circ. DFPA nº 047/1998), arsenicais e antimoniais (Portaria nº 31, 29/01/2002), cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003), olaquinox (IN nº 11, 24/11/2004), carbadox (IN nº 35, 14/11/2005), violeta de genciana (IN nº 34, 13/09/2007), espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012) e colistina (IN nº 45, 22/11/2016).

Em dezembro de 2018 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou uma portaria - Portaria Nº 171, 13/12/2018 - informando a intenção de proibir o uso de tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018). Ainda assim, somente em 2020 foi regulamentada a proibição do uso, como aditivos alimentares, dos antimicrobianos tilosina, lincosamida e tiamulina (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2020), não se confirmando a restrição, até o momento, do uso da bacitracina e da virginiamicina para este fim. Virginiamicina, tilosina e bacitracina estão proibidas na União Europeia desde 1999 (XIONG; SUN; ZENG, 2018).

As restrições ao uso de antimicrobianos em animais de produção têm sido justificadas, principalmente, pelo surgimento de cepas bacterianas resistentes às drogas utilizadas na produção animal; entretanto, a presença de resíduos em alimentos e no ambiente também são importantes. O uso prudente de antimicrobianos se configura em uma das estratégias mundiais para minimizar os riscos à saúde humana associados ao uso de antimicrobianos, principalmente, uso não-humano.

Nesse sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem trabalhado, desde 2003, na elaboração da lista de antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana. A primeira lista foi publicada em 2005 e vem sendo revisada regularmente, tendo sua sexta edição publicada em 2018. A lista é um documento destinado às autoridades de saúde pública e saúde animal, médicos e médicos veterinários, dentre outras partes envolvidas, no sentido de orientar

os profissionais quanto à necessidade do uso prudente dos antimicrobianos para garantir principalmente a eficácia das drogas criticamente importantes em medicina humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, há evidências de que o aumento no volume de uso de antimicrobianos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de resistência. Além disso, consequências adversas para a saúde humana, como aumento na frequência e gravidade de infecções, e falhas no tratamento podem estar relacionadas a organismos resistentes resultantes, principalmente, do uso não-humano de antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

2.3 Resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli*

A resistência bacteriana é um atributo natural utilizado pelas bactérias para a sua sobrevivência e manutenção no ambiente e em seus hospedeiros (D’COSTA et al., 2011; GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017). No entanto, há evidências que o incremento no uso de drogas antibacterianas tem aumentado a população de bactérias resistentes trazendo prejuízos para a saúde humana e animal, sendo considerado um problema de saúde pública (GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017; MANYI-LOH et al., 2018; XIONG; SUN; ZENG, 2018).

Para que se possa entender, rastrear e controlar a disseminação de populações bacterianas resistentes é necessário monitorar todo o sistema. O uso de micro-organismos indicadores é uma prática consagrada no monitoramento de ambientes de criação de animais, processamentos de alimentos e ambientes hospitalares. A utilização desses organismos busca fazer inferências quanto à contaminação do ambiente, indicando falhas nos processos e a possível presença de patógenos que estariam presentes em quantidades baixas e difíceis de serem detectadas (FORSYTHE, 2013). Da mesma forma, indicadores bacterianos são frequentemente utilizados para verificar e monitorar padrões de resistência a antimicrobianos (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

Dentre as bactérias Gram negativas, *E. coli* é o micro-organismo eleito como indicador para o monitoramento de resistência (ECDC, EFSA, EMA, 2017). Anaeróbico facultativo predominante no trato gastrointestinal da maioria das espécies animais e de humanos, sua população nas fezes pode variar entre 10^7 a 10^9 organismos por grama, tornando-o o organismo frequentemente dominante em cultura aeróbica de fezes de animais saudáveis (GYLES et al., 2010). Tais características contribuem para que esse micro-organismo seja considerado um bom indicador tanto de condições de higiene em ambiente de processamento de alimentos, quanto

para monitoramento de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram negativas. Sendo assim, os estudos realizados com o objetivo de monitorar ou verificar os padrões de resistência a antimicrobianos em populações bacterianas Gram negativas têm *E. coli* como micro-organismo padrão.

Escherichia coli, assim como as demais bactérias, podem ser intrinsecamente resistentes a antimicrobianos ou se tornarem resistentes a essas drogas. Sendo assim, a resistência antimicrobiana pode ser classificada como natural ou adquirida.

A resistência natural, ou também chamada de intrínseca, ocorre quando há ausência de um processo metabólico influenciável pelo antimicrobiano, ou a presença de particularidade na morfologia bacteriana que impede a sua ação. A resistência adquirida é uma propriedade de um dado isolado, que pode ser desenvolvida devido à mutação no DNA ou pela aquisição de um gene de resistência por transferência horizontal (PU; GONG; SUN, 2019).

A partir do surgimento de um isolado resistente, populações bacterianas inicialmente susceptíveis a determinado antimicrobiano podem tornar-se resistentes, geralmente após seleção resultante do uso do princípio ativo. Em geral, a resistência antimicrobiana está relacionada a um dos seguintes mecanismos, *i*) modificações do alvo antimicrobiano (diminuindo a afinidade pelo fármaco), *ii*) diminuição da captação do fármaco, *iii*) ativação de mecanismos de efluxo para extrusão da molécula prejudicial, *iv*) mudanças globais em vias metabólicas importantes via modulação de redes reguladoras; ou *v*) inativação da droga (MUNITA; ARIAS, 2016).

2.3.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados na produção animal e/ou criticamente importantes para saúde humana

2.3.1.1 Resistência a aminoglicosídeos

A primeira molécula representante da classe dos aminoglicosídeos (estreptomicina) foi isolada de *Streptomyces griseus* em 1944. Este foi o primeiro antimicrobiano utilizado na terapia da tuberculose. Outras moléculas similares à estreptomicina foram isoladas ao longo do tempo, prioritariamente, de micro-organismos como *Streptomyces* e *Micromonospora*. Fazem parte desta classe de antimicrobianos, além da estreptomicina, neomicina, canamicina, paromomicina, gentamicina, amicacina tobramicina, netilmicina, espectiomicina, sisomicina, dibecacina, isepamicina e plazomicina (KRAUSE et al., 2016; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011).

Bactericidas, os aminoglicosídeos agem inibindo a síntese proteica a partir da ligação ao sítio A da subunidade 16S rRNA do ribossomo procarioto. Para atingir o sítio de ação a molécula necessita chegar ao citoplasma bacteriano através da parede e membrana celular. Este processo é composto de três etapas: i) ligação iônica – ligação do antimicrobiano às porções aniônicas do lipopolissacarídeo (LPS), fosfolipídeos e proteínas da membrana externa de bactérias Gram negativas e aos fosfolipídeos e ácidos teicóicos em bactérias Gram positivas; ii) difusão transmembrana - difusão através dos canais de porina da membrana externa que entram no espaço periplasmático, e iii) ligação ao alvo ribossomal (ALVES, 2016; KRAUSE et al., 2016).

Antimicrobianos de amplo espectro, os aminoglicosídeos são intrinsecamente ineficazes contra bactérias anaeróbicas devido à incapacidade de penetração nesses micro-organismos. Sendo assim, a necessidade de atingir o citoplasma bacteriano pode ser visto como um dos principais mecanismos de resistência bacteriana intrínseca frente a essas moléculas.

Contudo, semelhante a outras classes de antimicrobianos, a resistência bacteriana adquirida é reportada também nesta categoria. Os três mecanismos mais comuns de resistência aos fármacos da classe são: (i) redução da concentração intracelular do fármaco - resultado da redução da permeabilidade ou ação das bombas de efluxo; (ii) mutação espontânea do alvo ribossomal; e (iii) modificação/inativação do antimicrobiano por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

A inativação da molécula pela atividade das AMEs é reconhecida como o mecanismo de resistência mais importante nesta classe de fármacos. Essas enzimas são, frequentemente, codificadas em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, facilitando sua disseminação entre os micro-organismos. Já foram descritas três classes de AMEs: aminoglicosídeo acetiltransferases (AACs), aminoglicosídeo fosfotransferases (APHs), também conhecidas como quinases e aminoglicosídeos nucleotidiltransferases (ANTs) (POIREL et al., 2018).

As classes são divididas em subtipos nomeados de acordo com a posição no aminoglicosídeo que a enzima modifica seguido por um algarismo romano e, em alguns casos, uma letra quando existem várias enzimas que modificam a mesma posição como, por exemplo, AAC (6) - IV ou AAC (3) – IIa (ALVES, 2016; KRAUSE et al., 2016). Devido a sua importância na resistência bacteriana frente aos aminoglicosídeos, essas moléculas têm sido foco de estudos para novos antimicrobianos e inibidores (ZÁRATE et al., 2018).

O espectro de ação das AMEs é bastante diverso. Diferentes genes codificam enzimas com espectro de ação distinta frente aos antimicrobianos da classe. Enquanto ANT (3''), (6) e

(9) conferem resistência somente à estreptomicina e espectinomicina, ANT (2'') tem ampla atividade aos aminoglicosídeos e AAC (6') Ib-cr pode conferir resistência também às fluoroquinolonas (KRAUSE et al., 2016; ZÁRATE et al., 2018).

A prevalência de cepas de *E. coli* resistentes aos aminoglicosídeos, isoladas de frangos saudáveis ou de carne de frango, pode variar quanto à região e ao antimicrobiano testado, a exemplo da estreptomicina, que apresenta frequências de 9,7% a 61,9% (ABRAHAM et al., 2019; JAJA et al., 2020; MOAWAD et al., 2017; NAYME et al., 2019; VAN DUIJKEREN et al., 2019; VARGA et al., 2019). A resistência em *E. coli* de origem humana e animal é frequentemente causada pelas enzimas AAC (3) - II / IV e AAC (6) – Ib as quais podem conferir resistência a diversos representantes da classe como, por exemplo, tobramicina, gentamicina, amicacina, canamicina, neomicina, entre outros (VAN DUIJKEREN et al., 2019; ZÁRATE et al., 2018).

A exemplo de outras classes constantes da lista de antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana, os aminoglicosídeos têm seu uso terapêutico autorizado em animais de produção em muitos países. A gentamicina, por exemplo, é utilizada em combinação com a vacina de Marek para injeção *in ovo* nos Estados Unidos (VAN DUIJKEREN et al., 2019). O uso da gentamicina é difundido entre os produtores de frango da Nigéria (ONYEANU; EZENDUKA; ANAGA, 2020). No Brasil, representantes da classe (espectinomicina, canamicina e neomicina) também tem seu uso regulamentado na terapêutica de aves (BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

2.3.1.2 Resistência a betalactâmicos

Betalactâmicos são antimicrobianos caracterizados pela presença de uma estrutura central comum, na qual está localizado um anel beta-lactâmico, que dá origem à sua denominação. Pertencem a essa classe as penicilinas e derivados, cefalosporinas, cefamicinas carbapenêmicos, monobactâmicos e os inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (UR RAHMAN et al., 2018; VAN HOEK et al., 2011). O alvo dos betalactâmicos são proteínas conhecidas como PBPs – *penicillin binding protein* necessárias para a biossíntese da parede celular bacteriana. Assim, sua ação bactericida se dá a partir da ligação do antimicrobiano a uma ou mais proteínas de ligação à penicilina (PBP – sigla em inglês), impedindo a síntese adequada do peptídeo glicano e, conseqüentemente, da parede bacteriana (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Existem vários mecanismos de resistência aos betalactâmicos como: produção de beta-lactamases, expressão de PBPs alteradas, ausência ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, e supressão de bombas de efluxo (UR RAHMAN et al., 2018). No entanto, o mecanismo mais comum de resistência a esses antimicrobianos em bactérias Gram negativas é a produção de beta-lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico inibindo, assim, a ação do fármaco (PALZKILL, 2018). A primeira beta-lactamase – AmpC, expressa por *E. coli*, foi relatada em 1940 (JACOBY, 2009; VAN HOEK et al., 2011); após esse evento, várias famílias de beta-lactamases que conferem resistência a, praticamente, todos os betalactâmicos já foram reconhecidas.

As beta-lactamases podem ser classificadas por dois sistemas. De acordo com o sistema de Ambler, com base na homologia da sequência de aminoácidos, as beta-lactamases são distribuídas em quatro classes (A, B, C e D). As classes mais comuns (A, C e D) incluem as beta-lactamases com serina em seu sítio ativo, enquanto as de classe B são todas metaloenzimas que requerem zinco como um cofator de metal para suas atividades catalíticas. (PALZKILL, 2018; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020; UR RAHMAN et al., 2018; VAN HOEK et al., 2011). A segunda categorização é denominada como classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, que agrupa as diferentes enzimas, de acordo com seus perfis de hidrólise do substrato e resposta aos inibidores, em três grupos e vários subgrupos (BUSH; BRADFORD, 2019). A última classificação funcional atualizada é composta por três grupos: grupo 1 (classe C) cefalosporinases; grupo 2 (classes A e D) inibidores, beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases; e grupo 3 (classe B) metalo-beta-lactamases (UR RAHMAN et al., 2018).

Nessa diversidade de enzimas hidrolisantes, as ESBLs têm se destacado nos últimos anos devido à capacidade de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As ESBLs são incluídas nas classes A e D de Ambler, e nos grupos 2be ou 2d de Bush-Jacoby-Medeiros, sendo representadas por diferentes famílias (UR RAHMAN et al., 2018).

As beta-lactamases de classe A são frequentemente codificadas em plasmídeos que podem ser transferidos por conjugação. Entre as muitas ESBLs descritas em uma variedade de patógenos, os tipos TEM, SHV e CTX-M codificadas respectivamente, pelos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, estão disseminadas em vários nichos epidemiológicos. A evolução de variantes das enzimas TEM e CTX-M que aumentaram seu espectro de ação estabelecendo novas interações com os antimicrobianos betalactâmicos tem aumentado ao longo do tempo a resistência a essas drogas (PALZKILL, 2018). Outras famílias de ESBLs clinicamente

importantes incluem GES, PER, VEB, BES, BEL, SFO e TLA; mas estas ocorrem em menor frequência (BAJAJ; SINGH; VIRDI, 2016; BUSH; BRADFORD, 2019).

As beta-lactamases do tipo AmpC (grupo funcional 1 – classe de Ambler C) conferem resistência à maioria das cefalosporinas, incluindo as cefalosporinas de amplo espectro, como a ceftazidima, a cefotaxima e a ceftriaxona, bem como as cefamicinas, como a cefoxitina (BUSH; BRADFORD, 2019). Essas enzimas podem tanto ser expressas por genes cromossômicos quanto por genes mediados por plasmídeos. A resistência às cefalosporinas ocorre devido às mutações no promotor ou atenuador do gene, resultando em superexpressão da enzima. As bactérias que não possuem o gene cromossômico para AmpC podem adquiri-lo através de plasmídeos conjugativos (JACOBY, 2009). Diferentes famílias de β -lactamases do tipo AmpC têm sido descritas: CMY, ACC, ACT, DHA, FOX, MIR e MOX. As principais representantes da família mediadas por plasmídeo são codificadas, principalmente, pelo genes *bla*_{CMY/MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{FOX}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT/MIR} (BAJAJ; SINGH; VIRDI, 2016; JACOBY, 2009). Segundo Bajaj, Singh, Virdi (2016), os genes mais disseminados globalmente para ESBL e AmpC mediada por plasmídeo são, respectivamente, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CMY-2}.

Enzimas do tipo OXA foram, primariamente, capazes de inibir a ação de oxacilina. Essas beta-lactamases diferem das enzimas TEM e SHV pelo fato de se enquadrarem na classe molecular D e no grupo funcional 2d. Essas enzimas têm sido relatadas, principalmente, em *Pseudomonas aeruginosa* e sua importância tem aumento à medida que representantes da família podem apresentar fenótipo de ESBLs (OXA-11, OXA-14 e OXA-20), além de conferir resistência aos carbapenêmicos (OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181 e OXA-232) (BUSH; BRADFORD, 2019).

Os carbapenêmicos são inativados, principalmente, por enzimas dos tipos KPC, SME, NMC-A, IMI e certas variantes do GES. As variantes KPC-2 e KPC-3 têm a maior distribuição entre todas as carbapenemases de serina. A KPC foi detectada principalmente em *Klebsiella pneumoniae*, mas pode estar presente em muitos outros gêneros de enterobactérias. As enzimas do tipo KPC não são inibidas pelo clavulanato ou tazobactam; no entanto, são potentemente inibidas pelo avibactam e pelo vaborbactam. As enzimas GES foram inicialmente relatadas como ESBLs, mas uma única mutação pontual expandiu o espectro dessas enzimas, adicionando atividade de hidrólise de carbapenêmicos em GES-2, GES-4, GES-11 e GES-14 (BUSH; BRADFORD, 2019).

A crescente preocupação com a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e o papel dos animais como reservatórios desses micro-organismos é uma constante nas pesquisas que tratam a questão da resistência. Com as ESBLs isso não é diferente, uma vez que

animais destinados à produção de alimentos, especialmente frangos, têm sido considerados um importante reservatório de bactérias produtoras de beta-lactamases (DAME-KOREVAAR et al., 2019; PROJAHN et al., 2018).

A diversidade de *E. coli* produtora de ESBLs em ambiente de produção avícola de frangos de corte e galinhas poedeiras na Holanda foi investigada por Blaak et al. (2015). Nesse estudo, a maioria dos isolados (98%) carregavam algum dos genes codificadores de ESBL, totalizando a identificação de 25 genes diferentes, sendo que os principais genes encontrados foram *bla*_{CTX-M-1} (41%), *bla*_{SHV-12} (29%) e *bla*_{TEM-52} (28%). A distribuição desses três genes foi diferente conforme o tipo de exploração: *bla*_{CTX-M-1} esteve presente em 32% e 50% dos isolados de frangos de corte e de poedeiras, respectivamente; *bla*_{SHV-12} não foi amplificado em isolados de *E. coli* de poedeiras; e *bla*_{TEM-52} esteve presente em 22% dos isolados de *E. coli* em frangos de corte e em 50% dos isolados de poedeiras. Ainda na Holanda, o gene *bla*_{CTX-M-1} também foi o mais frequente em isolados de *E. coli* de frangos de corte provenientes de sistema de criação orgânica (VAN HOEK et al., 2018).

CTX-M, CTX-M-1, SHV-2, OXA-48 e NDM-1, foram reportadas em ambiente avícola e carne de frango em estudo realizado no Paquistão em 2018. Nesse estudo o percentual de *E. coli* produtora de ESBL foi de 38,8% no ambiente avícola e de 47,6% na carne de frango (UR RAHMAN; AHMAD; KHAN, 2019). No Nepal, CTX-M-15 foi o gene mais prevalente em *E. coli* isoladas de frangos saudáveis de granjas comerciais e não comerciais (HOSURU SUBRAMANYA et al., 2020). A predominância de genes que codificam enzimas do tipo CTX-M também foi relatada em carne de frango na Turquia, além da alta prevalência (52,14%) de *E. coli* produtora de ESBL reportada no estudo (BARAN; ADIGÜZEL; YÜKSEL, 2020). Os principais genes amplificados em *E. coli* com fenótipo para ESBL, isoladas de frangos na Colômbia, foram *bla*_{CMY-2} (75%) e *bla*_{SHV-12} (11%); foram verificados, ainda, isolados que carregavam mais de um gene codificador para ESBLs (*bla*_{CMY-2} e *bla*_{SHV-12}) e (*bla*_{CMY-2} e *bla*_{SHV-5}) (CASTELLANOS et al., 2017). Os genes *bla*_{CMY-2} e *bla*_{SHV-12} também foram os mais frequentes em isolados de frangos em abatedouro frigorífico na Alemanha (VON TIPPELSKIRCH et al., 2018).

Considerando que os incubatórios de aves podem ter um papel importante na disseminação de micro-organismos resistentes, Osman et al. (2018) verificaram a presença de *E. coli* produtora de ESBL em ambiente de incubação e em aves recém eclodidas. A distribuição de genes de beta-lactamases encontrados foi como segue: de classe A, *bla*_{TEM} (96,9%), *bla*_{SHV} (16,9%), *bla*_{OXA-1} (60%) e beta-lactamases do tipo AmpC, *bla*_{MOX-like} (38,4%), *bla*_{CIT-like} (3,0%) e *bla*_{FOX} (27,7%).

No Brasil, um dos maiores produtores de carne de frango do mundo, a frequência de bactérias produtoras de ESBL também tem sido relatada em diferentes etapas da cadeia avícola. Recentemente, Rabello e colaboradores (2020), revisando dados brasileiros sobre resistência antimicrobiana em bactérias associadas a animais verificaram estudos com isolados de 2010 a 2016 nas regiões sul e sudeste do país. Esses estudos demonstraram a presença de genes codificadores de ESBL em amostras de animais (suabes cloacais), carne e carcaça de frangos. Nesta revisão, os autores relatam como mais frequentes nesse tipo de amostra as enzimas pertencentes às classes CTX-M, SHV, CMY e TEM.

Quanto a frequência desses genes em estudos realizados no Brasil, *bla*_{CTX-M-2} esteve presente em 88,2% de *E. coli* isoladas de porções de carne de frango e em 68,4% das isoladas de suabes cloacais no estudo realizado por Casella et al. (2018). Koga et al. (2015) analisando bacteriotecas de *E. coli* isoladas de frango nos anos de 2007 e 2013, observou a presença de ESBLs somente nas bactérias isoladas em 2013. Nessas, a frequência de ESBL foi de 32,2% sendo a classe CTX-M a mais frequente, presente em 64,1% dessas cepas. Diferente dos estudos mencionados anteriormente, o gene *bla*_{CMY-2} foi o mais frequente em carcaças de frangos analisadas por Botelho et al. (2015) no ano de 2010.

Cepas bacterianas produtoras de ESBL foram reportadas em diversos países isoladas de várias espécies de animais produtores de alimentos. Mesmo que os genes codificadores dessas enzimas variem conforme o tipo e a frequência nas diferentes regiões ou tipos de produção, sua presença deve ser tomada como um alerta para a possibilidade de disseminação dessas bactérias e seu arsenal de genes de resistência a partir da cadeia produtiva de alimentos de origem animal.

2.3.1.3 Resistência às polimixinas

As polimixinas são antibióticos polipeptídicos obtidos pela primeira vez em 1947 a partir de *Bacillus polymyxa* (reclassificado posteriormente como *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*) (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; SRINIVAS; RIVARD, 2017). A combinação de cinco diferentes análogos estruturais classifica as polimixinas de A à E. Porém, apenas as polimixinas B e E (colistina) são utilizadas terapêuticamente (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). As polimixinas compartilham os mesmos mecanismos de ação e os estudos que analisam os mecanismos de resistência à colistina são comumente realizados com polimixina B (SEKYERE et al., 2016). As polimixinas são uma das classes antimicrobianas de última linha com atividade frente a bastonetes Gram negativos multirresistentes. No entanto,

com o aumento do uso de polimixinas nos últimos anos, os relatos de resistência também aumentaram (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

O principal alvo das polimixinas é a membrana celular bacteriana que é rompida através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Por ligação ao lipopolissacarídeo (LPS) na membrana externa de bacilos Gram negativos, a molécula de polimixina carregada positivamente interage com os grupos fosfato carregados negativamente na porção lipídica A do LPS, desestabilizando assim a membrana externa. Como resultado desta desestabilização, a molécula de polimixina é capaz de inserir suas regiões hidrofóbicas no interior da membrana externa, aumentando a ruptura da membrana e facilitando a captação de polimixinas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

A aquisição da resistência à colistina em bactérias Gram negativas tem sido atribuída a modificações no lipopolissacarídeo (LPS) por diversas vias, incluindo: *i*) a adição de grupos catiônicos ao LPS, reduzindo a carga negativa do LPS e conseqüentemente impedindo a fixação de polimixinas; *ii*) perda do LPS e, conseqüentemente, perda do alvo da polimixina; *iii*) a superprodução de polissacarídeo de cápsula (CPS) ocultando os locais de ligação da polimixina; e *iv*) liberação, pela cápsula, de estruturas de captação das polimixinas. Além disso, ainda podem ocorrer modificações específicas das porinas da membrana externa e superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017). Todos esses eventos são mediados cromossomicamente e envolvidos com a modulação de um sistema regulador (LIU; LIU, 2018). Dessa forma, a disseminação da resistência à colistina em populações bacterianas foi, por muito tempo, atribuída somente à transferência vertical de genes.

A possibilidade de transferência horizontal de resistência às polimixinas só passou a ser investigada recentemente, a partir da identificação de um gene mediado por plasmídeo capaz de conferir resistência a esses fármacos (LIU et al., 2016). A partir de então, a abordagem utilizada para o monitoramento de micro-organismos resistentes às polimixinas, especificamente à colistina, passou a ser a identificação desses genes *mcr* (*mobile-colistin-resistance*), considerada uma assinatura de resistência ou suscetibilidade reduzida a esses fármacos (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017).

Desde a sua descoberta em 2015 (LIU et al., 2016), vários estudos relatando isolados positivos para *mcr-1* têm sido publicados e indicam uma disseminação mundial desse gene (WANG et al., 2018). Além do gene *mcr-1*, novos genes *mcr* já foram relatados (*mcr-1* a 10) em bactérias da família Enterobacteriaceae (LIMA et al., 2019; LIU; LIU, 2018). Devido ao

uso frequente de colistina em animais produtores de alimentos (LIMA et al., 2019; LIU; LIU, 2018) esses têm sido sugerido como possíveis reservatórios e disseminadores desses genes (BITRUS; CHUANCHUEN; LUANGTONGKUM, 2018; GUENTHER et al., 2017; IRRGANG et al., 2016; MONTE et al., 2017; PERRIN-GUYOMARD et al., 2016; YASSIN et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

A prevalência de *mcr-1* em bactérias isoladas de animais de produção, fenotipicamente resistentes à colistina, na Alemanha foi de 79,8%, sendo a cadeia produtiva de aves (perus e frango) responsável pela maior prevalência de isolados positivos para o gene (IRRGANG et al., 2016). Em isolados de *E. coli* investigados na França, todos os isolados fenotipicamente resistentes à colistina (MIC>2mg/L) carregavam o gene *mcr-1* e, mais uma vez, isolados provenientes de perus (5,9%) e frangos (1,8%) apresentaram maior frequência de amplificação do gene, se comparado a outras cadeias produtivas como a suína, com 0,5% de frequência do gene (PERRIN-GUYOMARD et al., 2016).

O gene *mcr-1* também foi identificado em isolados de *E. coli* de carne de frango no Brasil (MONTE et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2020) e em amostras fecais de frango na Romênia (MACIUCA et al., 2019). A prevalência do gene em amostras de frangos no Vietnã foi de 59,4% (TRUNG et al., 2017). Em estudo realizado em Bangladesh no qual foram pesquisados *mcr-1* a 5, o gene mais frequente ainda foi *mcr-1*, presente em 28,9% das amostras de fezes de frango, o gene *mcr-2* foi identificado em 3,4% dos isolados (ISLAM et al., 2020). A frequência de *mcr-1* em outro estudo semelhante, realizado no mesmo país, foi de 13,5% (AMIN et al., 2020). Embora existam diversos estudos pesquisando a presença do gene *mcr* em bactérias resistentes à colistina, esses estudos são, na sua maioria, alvo-específico, demonstrando a prevalência apenas do gene *mcr-1*.

Com a descoberta de novas variantes do gene *mcr* (1 a 10), a possibilidade do sequenciamento de genomas bacterianos completos e a busca *in silico* de sequências codificadoras, essas variantes podem ser investigadas, inclusive, em bactérias depositadas em bancos de dados genômicos isoladas ao longo do tempo. Essas novas ferramentas podem ampliar o conhecimento sobre a evolução desta resistência tão importante para a saúde humana e animal. Neste sentido, após a descrição do gene *mcr-10*, pesquisadores realizaram um estudo epidemiológico molecular rastreando o gene em cepas depositadas no *GenBank*. A nova variante *mcr* foi identificada em 30 genomas bacterianos e em quatro plasmídeos. Os genomas positivos datavam de 1998 a 2018 e representam, na sua maioria, bactérias isoladas de humanos (WANG et al., 2020).

A colistina tem sido utilizada, por décadas, em medicina veterinária para o tratamento e prevenção de doenças (POIREL; JAYOL; NORDMANNA, 2017). Sua aplicação em rações para frangos e suínos como promotores de crescimento também foi muito difundida (LIU; LIU, 2018; MAZUTTI et al., 2016). No entanto, por ser considerado um antimicrobiano criticamente importante para a saúde humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), tal prática tem sido descontinuada em muitos países. No Brasil, o uso da colistina como promotor de crescimento está proibido desde 2016 (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). União Europeia, China, Estados Unidos, Malásia, e Índia também descontinuaram seu uso em rações.

O questionamento quanto à eficiência da ação de restrição do uso dos antimicrobianos frente à redução na resistência bacteriana é uma constante nas discussões relativas ao tema. Nesse sentido, um estudo realizado na China avaliando os efeitos da retirada da colistina na agropecuária e a frequência de cepas resistentes em humanos e animais, descreveu uma redução significativa da resistência ao fármaco após a proibição do uso desta polimixina como promotor de crescimento para animais. A prevalência de *E. coli* resistente à colistina antes e após a proibição passou de 34% para 5% em suínos, e de 18% para 5% em frangos, demonstrando a efetividade na redução da resistência bacteriana quando da ausência da pressão de seleção, pelo menos para este fármaco (WANG et al., 2020).

2.3.1.4 Resistência às quinolonas

A primeira quinolona (ácido nalidíxico) foi descoberta em 1962, durante o processo de síntese e purificação de cloroquina – agente anti-malária (VAN HOEK et al., 2011). Desde então, devido à sua eficiência frente à maioria das bactérias da família Enterobacteriaceae, as quinolonas são utilizadas, terapêuticamente, na medicina humana e veterinária (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). Modificações na estrutura química da substância derivaram novos compostos antibacterianos existindo, atualmente, quatro gerações de quinolonas/fluoroquinolonas utilizadas clinicamente com diferentes espectros de ação (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais quinolonas e fluoroquinolonas e seu espectro de ação

| Geração | Medicamento/Droga | Espectro de ação |
|----------------------------------|-------------------|---|
| Primeira geração | Ácido nalidíxico | Gram negativas |
| | Ácido oxonílico | |
| Segunda geração/fluoroquinolonas | Norfloxacin | Ampla espectro, incluindo algumas Gram positivas |
| | Enrofloxacin | |
| | Ciprofloxacina | |
| | Ofloxacin | |
| Terceira geração | Levofloxacin | Gram negativas e Gram positivas |
| Quarta geração | Trovafloxacin | Gram negativas, Gram positivas e bactérias anaeróbicas |
| | Moxifloxacin | |
| | Gemifloxacin | |
| | Garefloxacin | |

Adaptada de Redgrave et. al, (2014); Phan, T.D.M.; Ziora, Z.M. e Blaskovich, M.A.T. (2019).

Essas moléculas atuam nas bactérias inibindo a atividade de duas topoisomerasas essenciais do tipo II, a DNA girase e a topoisomerase IV, impedindo, assim, a replicação do DNA bacteriano. Tanto a DNA girase, quanto a topoisomerase IV, são compostas por duas subunidades GyrA e GyrB, e ParC e ParE, respectivamente (CORREIA et al., 2017; PHAN, ZIORA, BLASKOVICH; 2019).

A aquisição da resistência à quinolona pode estar associada a três tipos de mecanismos: *i*) mutações cromossômicas que alteram as enzimas alvo e sua afinidade de ligação ao fármaco; *ii*) mutações cromossômicas levando à redução do acúmulo de drogas, por diminuição da captação ou aumento do efluxo; e *iii*) genes de resistência adquiridos por plasmídeo, produzindo proteínas de proteção ao alvo, enzimas modificadoras de drogas ou bombas de efluxo de drogas (CORREIA et al., 2017).

O mecanismo mais comum de resistência a essas moléculas está relacionado com mutações de, pelo menos, um dos genes que codificam as topoisomerasas tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*). A região onde ocorrem essas mutações é denominada de região determinante de resistência às quinolonas (*Quinolone Resistance Determinant Region* - QRDRs). As mutações nas QRDRs (sigla em inglês) desses genes resultam em substituições de aminoácidos que alteram estruturalmente a proteína-alvo e, conseqüentemente, sua afinidade de ligação ao

fármaco (CORREIA et al., 2017; HU et al., 2017; REDGRAVE et al., 2014; PHAN; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

Em bactérias Gram negativas, as quinolonas dependem dos canais de porina da membrana externa para entrar na célula. Assim, mutações que resultam em perda de porina, regulação negativa de porina ou modificação do tamanho ou condutância do canal de porina resultarão em uma difusão limitada de quinolonas e, conseqüentemente, levarão à resistência a esses fármacos (REDGRAVE et al., 2014). Outro mecanismo de resistência está relacionado à alteração na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC (em *E. coli*), em virtude de mutações nos genes reguladores, resultando em superexpressão de sistemas de efluxo (CORREIA et al., 2017).

No que se refere à transferência horizontal, a resistência à quinolona mediada por plasmídeos (PMQR) foi descrita pela primeira vez no final da década de 1990. O primeiro gene de PMQR, *qnrA* foi descrito em 1998 em um plasmídeo conjugativo. Cerca de 100 variantes de *qnr* foram identificadas, sendo classificadas em seis famílias distintas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrVC*. As proteínas Qnr conferem resistência às quinolonas, protegendo fisicamente a DNA-girase e a topoisomerase IV da inibição das quinolonas. Contudo, outros mecanismos de resistência ainda podem ser mediados por PMQR como a diminuição da atividade do fármaco pela presença de uma variante do aminoglicosídeo acetil transferase (*aac(6')-Ib-cr*) e bombas de efluxo (QepA e OqxAB), também codificadas pelo plasmídeo (CORREIA et al., 2017; REDGRAVE et al., 2014; VAN HOEK et al., 2011).

Considerando a importância da transmissão horizontal de genes para a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos, estudos têm sido realizados no sentido de monitorar tal disseminação. A resistência às quinolonas mediada por plasmídeo foi detectada em 15,3% dos isolados de *E. coli* de suínos na Coreia (HU et al., 2017). Ainda na Coreia, 13,3% das *E. coli* isoladas de frangos apresentaram resistência mediada por plasmídeo PMQR com a presença dos genes *qnrB* (9,3%), *qnrS* (2,7%) e *aac* (1,3%) (SEO; LEE, 2018). No Brasil, PMQR estiveram presentes em (23%) bactérias da família Enterobacteriaceae isoladas de frangos, nesses plasmídeos foram identificados os genes *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* (FERREIRA et al., 2018).

Devido a sua importância em saúde pública, quinolonas são classificadas como antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017, 2019). O uso do medicamento como aditivo zootécnico na produção de animais para a alimentação humana é proibido no Brasil desde 2009 - IN nº 26, 9/07/2009 (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009). Por outro lado, representantes desta classe de antimicrobianos ainda são aprovados para o uso

terapêutico em animais na China e no Brasil, além de outros países como França e Espanha (ROTH et al., 2019a).

2.3.1.5 Resistência às tetraciclinas

Tetraciclinas são antimicrobianos amplamente utilizados devido ao seu amplo espectro de ação (Gram negativas, Gram positivas, espiroquetas, bactérias intracelulares obrigatórias e alguns protozoários). Clortetraciclina, descoberta em 1948, foi a primeira representante desse grupo. Produzida por *Streptomyces aureofaciens* é uma das tantas tetraciclinas naturais (oxitetraciclina, terramicina, tetraciclina, de-metil-clortetraciclina), semissintéticas (metaciclina, rolitetraciclina, limeciclina, doxiciclina, minociclina, omadaciclina) ou sintéticas (eravaciclina) descobertas ao longo dos anos.

Em 1993, após já terem sido relatados mecanismos de resistência específicos para esses compostos, foi descoberta a tigeciclina. Sua introdução na terapêutica clínica ocorreu em 2005 e continua sendo uma opção para o tratamento de patógenos resistentes aos demais representantes do grupo (CHUKWUDI, 2016; GROSSMAN, 2016; SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2011). Esse composto de glicilciclina é incluído, atualmente, como um dos antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Além da tigeciclina, omadaciclina e eravaciclina são uma alternativa para o tratamento infecções causadas patógenos multirresistentes (GROSSMAN, 2016).

Antimicrobianos, geralmente bacteriostáticos, as tetraciclinas agem na inibição da síntese proteica a partir da interação com o RNA ribossômico 16S, aparentemente na subunidade 30S (CHUKWUDI, 2016; GROSSMAN, 2016). A molécula é absorvida pela célula bacteriana de Gram negativas através de porinas (OmpF e OmpC) (GROSSMAN, 2016).

Os três principais mecanismos envolvidos na resistência bacteriana às tetraciclinas são as proteínas de bombas de efluxo, as proteínas de proteção ribossômica, além da inativação enzimática do fármaco. Tais mecanismos podem estar vinculados à aquisição de elementos genéticos móveis carreando genes específicos de resistência, ou às mutações cromossômicas (CHUKWUDI, 2016; GROSSMAN, 2016; VAN HOEK et al., 2011). De acordo com a lista de genes de resistência à tetraciclina, mantida pela Universidade de Washington (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>) são descritos, atualmente, 36 genes que codificam bombas de efluxo; 13 genes de proteínas de proteção ribossomal, 13 genes responsáveis por modificação enzimática, 11 genes híbridos (mosaico) e um (*tetU*) cuja função ainda é desconhecida (ANEXO I).

As proteínas de proteção ribossômica de tetraciclina (RPPs – sigla em inglês) são codificadas por genes disseminados através de populações bacterianas em elementos genéticos móveis, e muitos dos genes são encontrados tanto em organismos Gram negativos quanto em Gram positivos. As RPPs mais comuns e melhor caracterizadas são Tet(O) e Tet(M), com 75% de similaridade de sequências entre si. Quanto às bombas de efluxo, Tet(A) e Tet(B) são as proteínas mais comumente encontradas em isolados clínicos Gram negativos.

A frequência de resistência bacteriana à tetraciclina, considerando *E. coli*, pode chegar a 95% em isolados de frangos com lesões de colibacilose (JAHANTIGH et al., 2020). Além disso, a resistência ao fármaco pode diferir dependendo da região estudada mesmo em frangos saudáveis. Um estudo de monitoramento realizado na Austrália em 2016, que analisou amostras representativas dos maiores produtores de frangos no país, observou apenas 19,4% de resistência à tetraciclina (ABRAHAM et al., 2019). A resistência à tetraciclina não diferiu significativamente entre os diferentes sistemas de produção na Itália, sendo de 64,3% em sistemas de produção convencional, 57,6% em livre de antimicrobianos e de 55,5% em sistema de produção orgânica (PESCIAROLI et al., 2020). No Canadá essa resistência esteve presente em 43% das amostras fecais de frangos (VARGA et al., 2019) e em 81,4% em isolados de *E. coli* em frangos da Zâmbia (PHIRI et al., 2020).

Os genes *tetA* e *tetB* foram identificados em 63,2% e 31,5%, respectivamente de *E. coli* resistentes à tetraciclina, isoladas de aves com colibacilose, entre os anos de 2013 e 2017, na Indonésia (KURNIA et al., 2018). O gene *tetA* também foi o mais frequente (86%) em isolados de *E. coli* proveniente da cadeia produtiva de frangos na Colômbia (VUTHY et al., 2017) e em 59% de *E. coli* isoladas de frango no Irã (ZIBANDEH et al., 2016). Noventa e sete por cento da resistência à tetraciclina em frangos com colibacilose no Iran foram atribuídos ao gene *tetA* (JAHANTIGH et al., 2020). O gene *tetX* é o mais frequentemente referenciado quando se trata de inativação enzimática de tetraciclinas, esse gene também pode ser carregado por plasmídeos e transposons (GROSSMAN, 2016).

A partir do conhecimento dos mecanismos pelos quais as bactérias se tornam refratárias aos antimicrobianos é possível monitorar a disseminação dessas populações. O uso de antimicrobianos tem sido visto como um dos impulsionadores para esses eventos, portanto, sua relação com o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem merecido atenção especial em programas de monitoramento de resistência.

2.4 Resistência em *E. coli* e o uso de antimicrobianos na produção animal

O monitoramento da resistência bacteriana tem buscado encontrar correlações que justifiquem o aumento de populações com suscetibilidade reduzida a antimicrobianos, a fim de intervir onde tais relações sejam evidentes. Correlações do uso de antimicrobianos na produção animal e aumento de cepas bacterianas resistentes são difíceis de obter pela escassez de dados quantitativos quanto ao uso desses medicamentos (MONTE et al., 2017). No entanto, nos países onde existem programas de monitoramento da resistência e uso de antimicrobianos na produção animal, é possível inferir, mesmo que indiretamente, o comportamento da resistência bacteriana em relação ao uso de antimicrobianos e, em alguns casos, verifica-se uma relação diretamente proporcional entre uso e resistência.

A partir de dados disponibilizados pela Agência Francesa de Medicamentos Veterinários (ANSES-ANMV), entre os anos de 2006 e 2016, Roth et al (2019) verificaram que o uso de penicilinas se manteve estável no país e o nível de resistência à amoxicilina também permaneceu inalterado (40%) naquele período. Além disso, a diminuição do uso da tetraciclina foi acompanhada pela redução nas taxas de *E. coli* resistentes a essa droga.

Apesar da importância dos programas de monitoramento, estudos experimentais comparando grupos tratados e não tratados podem evidenciar melhor a relação uso/resistência. Baron et al. (2014) verificaram aumento significativo de isolados de *E. coli* resistentes à cefalosporina de terceira geração em grupos de frangos tratados com o fármaco, se comparados com os grupos não tratados. A resistência à enrofloxacin, doxiciclina e sulfonamidas foram avaliadas por Miranda et al. (2008b). Nesse estudo, as taxas de resistência de *E. coli* intestinal aumentaram significativamente frente a todos os antimicrobianos testados durante o curso do tratamento terapêutico. Simoneit et al. (2015), após uma revisão sistemática da literatura científica, comparando a frequência de *E. coli* em animais submetidos a tratamentos antibacterianos com animais não tratados, também verificaram uma maior taxa de resistência (74%) em *E. coli* isoladas de animais que receberam terapia antibacteriana. Da mesma forma, a administração de cefalosporina de 3ª geração em ovos aumentou significativamente a prevalência de *E. coli* resistente ao longo da vida dos frangos (BARON et al., 2014).

A relação uso/resistência também pode ser observada quando se comparam as restrições de uso em diversos países e as taxas de resistência bacteriana (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013; TANG et al., 2017). Contudo, qualquer correlação de uso/resistência não é uma tarefa simples e sua interpretação deve ser criteriosa (NGUYEN et al., 2016). Diferentes taxas de resistência de *E. coli* isoladas de frangos são verificadas em diferentes países, conforme a proibição de uso de certas classes de antimicrobianos, podendo essas serem reduzidas conforme a restrição do seu uso. A redução da resistência à colistina, por exemplo, foi percebida em

humanos e animais após a proibição do uso deste antimicrobiano como promotor de crescimento para animais na China (WANG et al., 2020).

Por outro lado, o contrário também é verdadeiro; com frequência são verificadas taxas de resistência altas a antimicrobianos que não tem seu uso permitido em animais (ROTH et al., 2019b). Uma das explicações para isso pode ser a presença de cassetes gênicos que carregam genes capazes de conferir resistência a diferentes antimicrobianos (corresistência) e que seriam selecionados em blocos. Tal seleção não ocorre somente pelo uso de antimicrobianos, mas também pela presença de metais pesados ou desinfetantes no ambiente (CHENG et al., 2019; DENG et al., 2018; WALES; DAVIES, 2015).

Outra possibilidade seria o efeito de resistência cruzada na qual um princípio ativo pode selecionar bactérias resistentes para toda uma classe de antimicrobianos. Roth et al. (2019b), revisando dados da utilização de antimicrobianos nos principais países produtores de aves, verificaram alguns casos onde a resistência é alta, apesar da proibição do uso. Nos EUA foram identificadas cepas de *E. coli* resistentes a sulfametoxazol-sulfisixazol, antimicrobianos não permitidos para uso em aves naquele país. Da mesma forma, eritromicina e ácido oxolínico, não permitidos no Brasil, apresentaram taxas de resistência de 97 e 88%, respectivamente, em *E. coli* isolados de frangos. Em ambos os casos, existem drogas pertencentes a essas classes que são permitidas e utilizadas no país. No caso dos EUA, outras sulfonamidas são permitidas para uso em aves; e, no Brasil, outros macrolídeos (tilosina e tilmicosina) são usados (ROTH et al., 2019a).

A resistência cruzada foi um dos impulsionadores para a retirada de alguns antimicrobianos utilizados como melhoradores de desempenho nos países europeus. Avoparcina foi banida na Dinamarca e na Alemanha com o argumento de que induz resistência aos glicopeptídeos usados na medicina humana (CASTANON, 2007; MARSHALL; LEVY, 2011). Ainda sobre resistência cruzada e corresistência, Van Der Horst et al. (2013), pesquisando a administração de diferentes dosagens de amoxicilina, oxitetraciclina e enrofloxacina em frangos, verificaram resistência à amoxicilina em isolados de *E. coli* de frangos que haviam recebido oxitetraciclina, independente da dose utilizada. Após a remoção da pressão do uso de antibiótico, no entanto, a resistência retornou aos níveis de pré-exposição em todos os casos.

Estudos são realizados no sentido de determinar como o uso de antimicrobianos tem contribuído para o surgimento e manutenção de bactérias resistentes a essas drogas na criação de animais para alimentação humana. Nesse sentido, pesquisadores levantaram a hipótese de que a via de administração desses medicamentos também poderia interferir nesses eventos

(SIMONEIT et al., 2015). A hipótese é que a via oral, devido às diferenças de consumo do medicamento entre os animais tratados, poderia ser administrada em doses subletais selecionando, assim, micro-organismos resistentes. Além disso, a via de administração oral pode interferir na microbiota intestinal do hospedeiro proporcionando o aumento de patógenos oportunistas, bem como, impulsionar a resistência dessas bactérias (ZHOU et al., 2020).

O efeito da dose também pode ser um fator determinante para a manutenção de populações bacterianas resistentes, e é uma questão bastante discutida, pois a produção animal, principalmente aves e suínos, utiliza subdosagens de antimicrobianos como aditivos zootécnicos. Estudos comparando efeitos da dosagem de antimicrobianos em frango ainda são raros, em uma revisão realizada em 2015 apenas três estudos com esta abordagem foram relatados (SIMONEIT et al., 2015).

Quanto à dosagem, Van Der Horst et al. (2013) sugerem que um tratamento curto com uma dose alta (terapêutica) pode ser eficaz e representar, menor pressão seletiva para resistência do que a exposição prolongada. Sendo assim, a terapêutica aplicada adequadamente para o tratamento individual de animais tende a controlar o surgimento e a propagação de cepas resistentes aos antimicrobianos, em grande parte devido à sua aplicação em curto prazo e número relativamente pequeno de animais tratados.

O impacto do uso contínuo de doses subterapêuticas de clortetraciclina foi investigado em ratos com o objetivo de verificar seus efeitos na microbiota resistente à tetraciclina. Os autores verificaram que, embora o uso de clortetraciclina tenha impactado tanto na estrutura quanto na composição da comunidade microbiana fecal, não houve efeito significativo sobre a abundância de genes ou o surgimento de novos genes que conferem resistência à tetraciclina (BROOKS et al., 2009). Esse resultado sugere que o medicamento selecionou populações já resistentes à droga, não estimulando novas expressões de resistência, além disso, por se tratar de um ambiente controlado, os animais não foram expostos a populações bacterianas do ambiente não existindo a possibilidade de aquisição de outros genes.

A maioria das pesquisas relatam um aumento das populações bacterianas resistentes, enquanto os animais estão sob o efeito do antimicrobiano; porém, também mostram, frequentemente, a sua redução à medida que o tratamento cessa. Sugere-se que tal redução ocorra devido ao custo energético para manutenção desses mecanismos por parte das bactérias. Por outro lado, esse custo pode ser reduzido por mutações compensatórias em outras regiões do genoma, fazendo com que a reversão da resistência ocorra lentamente sendo antimicrobiano-dependente (DUNAI et al., 2019).

Em estudos de caso-controle, não se observa frequentemente diferença significativa frente às taxas de resistência entre os grupos caso e controle antes da intervenção com antimicrobianos (BARON et al., 2014; MIRANDA et al., 2008a; NGUYEN et al., 2016). Isso contribui com a ideia de que a resistência bacteriana é um mecanismo que pode ser transferido para a progênie (NGUYEN et al., 2016), podendo, no entanto, ser selecionado e estimulado quando a pressão de seleção aumenta, nesse caso, com o uso de antibacterianos.

A transferência vertical foi sugerida por Bortolaia; Bisgaard; Bojesen (2010), ao verificarem cepas de *E. coli* resistentes à ampicilina e ácido nalidíxico, associadas à mortalidade de pintos com uma semana de vida. Da mesma forma, Jiménez-Belenguer et al. (2016), ao analisarem aves de um dia de vida, verificaram a presença de cepas de *E. coli* resistentes a betalactâmicos, quinolonas e tetraciclinas. Acompanhando o crescimento desses frangos tratados com amoxicilina, a população de *E. coli* apresentou os maiores percentuais de resistência para o medicamento administrado.

Considerando a resistência como um mecanismo de proteção bacteriana, é provável que populações resistentes permaneçam em maior número no intestino das aves e no ambiente enquanto houver pressão de seleção. Segundo Marshall; Levy (2011), o uso de qualquer antimicrobiano poderá selecionar bactérias resistentes ao medicamento em questão, mas os ciclos prolongados de antimicrobiano em baixas doses criam pressões seletivas ideais para a propagação de cepas resistentes. Por outro lado, diferentes níveis de restrição do uso podem apresentar frequências de resistência semelhantes. Tang et al. (2019) verificaram que apesar das restrições completas demonstrarem índices de redução de 15% na resistência aos antimicrobianos, as restrições menos proibitivas, que permitem o uso terapêutico desses compostos, podem ser igualmente eficazes na redução da resistência, não sendo necessário, portanto, o completo banimento dos antimicrobianos na produção de animais para alimentação humana.

2.5 Transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos de animais para humanos

A possível transferência de bactérias resistentes a antimicrobianos entre animais e humanos tem sido o impulsionador para a restrição do uso de antimicrobianos na indústria de animais de produção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Essa transferência é sugerida ao longo do tempo através de estudos que verificaram correlação entre bactérias resistentes isoladas de animais e de humanos (MARSHALL; LEVY, 2011). Sendo assim, os animais têm sido considerados como reservatórios dessas bactérias (ABDELGADER et al.,

2018; OKORAFOR et al., 2019; OSMAN et al., 2018; SOUFI et al., 2010). Além disso, o ambiente no qual esses animais são alojados também pode manter resíduos de antimicrobianos estimulando a presença de cepas resistentes (SCHULZ et al., 2019).

Em se tratando da transferência ocupacional, estudos correlacionam essas populações de acordo com seu padrão de resistência ao fármaco e presença de genes de resistência. Porém, abordagens que determinam a proximidade genética dessas populações, justificariam melhor tal transferência. Ainda assim, a interpretação é complexa. Em estudo realizado por Korb et al. (2015), no qual a tipagem molecular foi utilizada para verificar a correlação de bactérias isoladas de frangos e de tratadores, os autores verificaram a disseminação ambiental das bactérias, porém não encontraram relação clonal entre os isolados de *E. coli* de tratadores e de frangos. Mesmo assim, não descartaram totalmente a possibilidade da existência de clones entre os isolados devido à similaridade genotípica (80%) encontrada entre os grupos. Contudo, mesmo a existência de grupos clonais não seria suficiente para correlacionar essas populações resistentes uma vez que mesmo no ambiente essas bactérias poderiam ter evoluído geneticamente da mesma forma.

O fato é que, de alguma forma, os trabalhadores estão expostos e carregam populações bacterianas resistentes. Price et al. (2007), comparando perfis de resistência de *E. coli* isoladas de trabalhadores de granjas avícolas e indivíduos da comunidade, verificaram que os trabalhadores das granjas apresentaram 32 vezes mais chance de carrear *E. coli* resistente à gentamicina e multirresistentes. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Oguttua; Vearya; Picard (2008) compararam isolados de frangos de corte, com isolados de trabalhadores do frigorífico no qual esses animais foram abatidos. Nesse caso, não observaram uma associação entre os micro-organismos isolados de trabalhadores e de frangos de corte. As divergências entre os dois estudos podem estar relacionadas ao tempo e forma de exposição à microbiota das aves. Ou ao fato de que os tratadores foram expostos aos antimicrobianos, não à aquisição da microbiota resistente dos frangos.

Outra forma dos humanos entrarem em contato com bactérias resistentes provenientes de animais é a partir do alimento. Depoorter et al. (2012), a partir de modelagem matemática, considerando dados de prevalência de *E. coli* resistente à cefalosporina de 3ª geração (CRE) na Bélgica, estimaram que a probabilidade de uma pessoa ser exposta a 1000 unidades formadoras de colônia (UFC) de CRE durante o consumo de carne de frango é de 1,5%, e que a maioria da exposição seria causada por contaminação cruzada na cozinha. Por outro lado, a contaminação de carnes de frango e pratos prontos para o consumo à base de carne de frango por *E. coli* resistentes a antibacterianos já foi documentada (ELUMBA; ALLERA; TAGANAS, 2018;

HUSSAIN et al., 2017; MONTE et al., 2017; SOMDA et al., 2018; YULISTIANI et al., 2017). Esse fato chama atenção para o controle da contaminação bacteriana em alimentos ao longo de toda a cadeia produtiva, seguindo a linha: “da fazenda ao prato”.

Segundo Xiong; Sun; Zeng, (2018), o uso de antimicrobianos em fazendas está ligado à emergência de genes de resistência a antibacterianos; porém se os animais são as fontes de transferência desses genes para patógenos humanos é uma questão ainda não respondida. Para Tang et al. (2017), o entendimento de que animais e seres humanos compartilham o mesmo ambiente corroboram com o conceito de Saúde Única, e sugerem que os efeitos de restringir o uso de antimicrobianos em animais podem se estender além dos próprios animais, contribuindo no controle amplo de populações bacterianas resistentes. No entanto, Vanderhaeghen; Dewulf (2017), ao comentarem o estudo de Tang et al. (2017), salientam que os reais efeitos dos antimicrobianos usados em animais sobre a resistência antimicrobiana em humanos ainda não estão suficientemente compreendidos, de forma a não desviar a atenção das responsabilidades na medicina humana em relação ao uso cauteloso de antimicrobianos em humanos.

O fato é que na tentativa de controlar o aumento da resistência bacteriana atrelada aos sistemas de produção animal, entidades governamentais e indústrias têm buscado alternativas para reduzir o uso de antimicrobianos. A substituição dos antimicrobianos por outras substâncias que possam interagir com a microbiota intestinal de forma a melhorar a conversão alimentar sem selecionar populações bacterianas resistentes (probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, entre outros) tem sido investigada (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMENSEEL, 2011; KURITZA; WESTPHAL; SANTIN, 2014; MEDEIROS et al., 2009; RAMOS, 2009). Além disso, a produção de aves em sistemas “alternativos” de criação, nos quais o uso de antimicrobianos é restrito, é uma realidade e tem evoluído em muitos países (BIRADAR et al., 2011; CRANDALL et al., 2009; DIAZ-SANCHEZ et al., 2015; ORBOI; BANES; PAUNCHICI, 2008; ROSSA; STERTZ; MACEDO, 2012; THORSØE; CHRISTENSEN; POVLSEN, 2016; VAN LOO et al., 2010).

2.6 Sistemas de produção “alternativos”

O consumidor está cada vez mais atento ao que chega à sua mesa, isso não se restringe aos benefícios nutritivos ou organolépticos dos alimentos. Há uma crescente preocupação, principalmente em relação aos produtos de origem animal, quanto à forma como esses animais vivem e os produtos que eles recebem ao longo da vida. Nessa perspectiva, sistemas convencionais de produção intensiva têm sido questionados em relação ao bem-estar dos

animais e os impactos na saúde humana, animal e ao meio ambiente frente às substâncias utilizadas na criação, gerando a necessidade de mudanças nesses sistemas ou alternativas para satisfazer esse consumidor.

Sendo assim, nos últimos anos houve um crescimento de produções alternativas a fim de atender tal demanda (BIRADAR et al., 2011; CRANDALL et al., 2009; ROSSA; STERTZ; MACEDO, 2012). O termo “sistemas alternativos de produção”, utilizado neste texto, refere-se a sistemas que surgiram como uma alternativa para os consumidores que não estão satisfeitos com os modelos intensivistas convencionais de produção. Nesse sentido, focando na preocupação mundial quanto ao uso de antimicrobianos nos sistemas de produção de proteína animal, abordaremos os sistemas de criação de frangos de corte que restringem, de alguma forma, o uso desses medicamentos, por exemplo, sistemas orgânicos e livres de antibióticos ou “*Antibiotic Free – AF*”.

Atendendo à demanda mundial para redução de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, as principais empresas produtoras de frangos no Brasil estão apostando na criação AF. No sistema AF, as aves não receberiam nenhum tipo de antibiótico, anticoccidiostático, melhoradores de desempenho a base de antibióticos ou quimioterápicos. A dieta é livre de ingredientes de origem animal. Não há restrições quanto a linhagem dos animais podendo também serem criados em confinamento total (DEMATTE FILHO; PEREIRA, 2017).

Enquanto no sistema AF o foco é a restrição de antimicrobianos, nos sistemas orgânicos toda a cadeia produtiva deve ser controlada. Segundo Orboi; Banes; Paunchici (2008), o sistema orgânico tem como principal objetivo otimizar a saúde e produtividade de comunidades interdependentes de solo, plantas, animais e seres humanos.

É comum que esses sistemas sejam regulamentados por organizações governamentais com o intuito de garantir ao consumidor que o produto adquirido seguiu rigorosamente as premissas do sistema. Essa garantia, muitas vezes, é oficializada pela aplicação de selos de garantia nas embalagens dos produtos (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014a; CRANDALL et al., 2009; DIAZ-SANCHEZ et al., 2015). Um estudo realizado na Dinamarca sobre o conhecimento dos consumidores frente a produtos orgânicos demonstrou um alto nível de confiança dos consumidores dinamarqueses no rótulo/selo orgânico dispensado aos produtos naquele país (THORSØE; CHRISTENSEN; POVLSEN, 2016).

No Brasil, os sistemas orgânicos ou agroecológicos são regulamentados por lei desde 2003 (BRASIL: PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2003). Além disso, os produtos orgânicos brasileiros devem ser certificados por organismos credenciados no Ministério da Agricultura

Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa certificação somente é dispensada quando a produção é realizada por agricultores familiares participantes de organizações de controle social cadastradas junto ao MAPA, e que comercializam, exclusivamente, em venda direta aos consumidores.

O sistema orgânico brasileiro é definido, por lei, conforme segue:

“Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003, p. 1).”

Quanto à produção de frangos de corte, a legislação ainda prevê, entre outras especificações, a densidade máxima de aves em galpões (10 frangos por m²), taxa de lotação das instalações em área externa (2,5 m² por frango) e a origem das aves que, no caso de não serem de criatórios orgânicos, só poderão entrar no sistema com até dois dias de vida. Da mesma forma que na criação AF, no sistema orgânico não são definidas as raças ou linhagens; no entanto, chama-se atenção para a necessidade de aves adaptadas às condições climáticas e ao manejo. A idade do abate também não é determinada pela legislação (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011, 2014b).

O uso de antimicrobianos não é permitido em nenhum dos dois sistemas. No caso dos orgânicos está previsto, em legislação, o tratamento de aves doentes ou feridas com medicamentos antimicrobianos convencionais com o intuito de evitar o sofrimento dos animais, porém, nesses casos, o produto não será mais considerado orgânico. Para que os produtos dos animais tratados com antimicrobianos convencionais possam ser reconhecidos novamente como orgânicos, o período de carência deverá ser duas vezes o período determinado na bula, tal prática só poderá ser utilizada, no máximo, duas vezes no período de um ano (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011, 2014b). Nos sistemas AF não há uma legislação específica que defina tal manejo. Contudo, o programa de cada empresa é aprovado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e certificado, de forma a garantir ao consumidor um produto livre de antibióticos.

A percepção de que os alimentos orgânicos são mais saudáveis, seguros e nutritivos são as principais razões destacadas pelos consumidores para o consumo desses produtos (CRANDALL et al., 2009; GALGANO et al., 2016; ŚREDNICKA-TOBER et al., 2016; VAN

LOO et al., 2010; WONG; AINI, 2017; XIE et al., 2015). Porém, ainda existem lacunas quanto às diferenças nutricionais e de segurança desses alimentos quando comparados aos alimentos de sistemas convencionais.

Para Galgano et al. (2016), os resultados de estudos científicos não sustentam a superioridade nutricional e de segurança dos alimentos orgânicos. A falta de evidências contundentes para superioridade nutricional dos alimentos orgânicos também foi mencionada por Dangour et al. (2010) e Forman; Silverstein (2012). Um dos benefícios mencionados em produtos orgânicos de origem animal foi o conteúdo mais elevado de ácidos graxos poli-insaturados no leite e carnes orgânicas (LAIRON, 2010; MIE et al., 2017). Ainda assim, tal diferença pode estar ligada ao tipo de alimentação e não ao sistema de produção empregado. Além disso, a impressão de bem-estar pode estar equivocada se considerarmos que esses animais podem estar mais suscetíveis às doenças (KARAVOLIAS et al., 2018).

A carne de frango é a primeira a ser adquirida por consumidores que estão migrando para esse novo nicho de alimentos (CRANDALL et al., 2009). Além disso, o curto ciclo de produção e a possibilidade de aumentar rapidamente a sua oferta, fez com que o frango se tornasse a carne orgânica mais importante para o mercado (BIRADAR et al., 2011).

Em se tratando da produção de origem animal, além das questões de bem-estar animal e respeito ao meio ambiente, a principal diferença entre os sistemas, que pode implicar na saúde humana, é a não utilização de antimicrobianos nos sistemas orgânicos (MIE et al., 2017) e no sistema AF. A percepção de que frangos orgânicos têm menos resíduos como, por exemplo, pesticidas, hormônios e antimicrobianos, é um dos motivadores para a escolha de compra frequente do produto (VAN LOO et al., 2010). Mesmo que os consumidores não tenham clareza sobre o fato da restrição de antimicrobianos ser vista como uma estratégia para a redução de micro-organismos resistentes que poderiam ser veiculados pelo alimento, estudos que comparam os perfis de resistência de bactérias isoladas de sistemas convencionais e sistemas com restrição no uso de antimicrobianos são úteis para verificar a consistência dessa hipótese.

2.6.1 Sistemas de produção “alternativos” e resistência antimicrobiana

A microbiota intestinal de frangos pode ser modulada conforme os sistemas de criação. Essa modulação pode estar relacionada a diferenças na alimentação, no acesso ao campo e pressão de seleção. Nos últimos anos pesquisas foram realizadas comparando bactérias isoladas de ambos sistemas a fim de verificar os efeitos da retirada de antimicrobianos nos sistemas alternativos frente à frequência de resistência bacteriana. Contudo, a comparação desses estudos

deve ser criteriosa uma vez que utilizam técnicas e metodologias distintas para sua realização. A origem dos isolados é diversa, podendo ser de conteúdo intestinal das aves, cama de frango, partes da carcaça ou carcaça inteira. Além disso, nem todos utilizaram *E. coli* como indicador, sendo que a família Enterobacteriaceae foi o alvo testado em alguns estudos. Os estudos diferem, ainda, quanto à interpretação dos resultados; por exemplo, a classificação de resistência intermediária foi considerada como resistente para alguns autores enquanto para outros é descrita separadamente, podendo subestimar ou superestimar essas frequências.

Comparando a suscetibilidade de enterobactérias isoladas de frangos orgânicos e convencionais na Espanha, bactérias resistentes a antimicrobianos foram isoladas de amostras dos dois sistemas, sendo significativamente maior no sistema convencional para a maioria (6/8) dos princípios ativos testados (MIRANDA et al., 2008b). Em estudo semelhante realizado no Brasil, também foi observada maior prevalência de enterobactérias resistentes à tetraciclina, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, sulfonamidas, cloranfenicol, doxiciclina, tobramicina, amoxicilina + ácido clavulânico, ácido nalidíxico e ciprofloxacina, isoladas de frangos criados em sistemas convencionais (ROSSA et al., 2013). Contudo, esse fenômeno não foi observado para todos os antimicrobianos testados. A resistência à tetraciclina foi alta nos dois sistemas: 60,59% nos frangos de sistema convencional e 47,64% nos isolados de frango orgânico. Todas as bactérias foram suscetíveis à amicacina e não houve diferença significativa entre os isolados frente à cefalotina e norfloxacina. Em contrapartida, *E. coli* isoladas de aves criadas em sistemas orgânicos nos Estados Unidos não apresentaram diferença significativa de resistência comparadas às isoladas de aves de sistemas convencionais (MILLMAN et al., 2013). A resistência à tetraciclina, tigeciclina e ceftazidima foram ligeiramente maiores em *E. coli* comensal de sistemas orgânicos na Áustria (MUCH et al., 2019).

Níveis altos de resistência podem ser observados tanto em sistemas de produção convencionais quanto em sistemas alternativos e, aparentemente, essas similaridades estão relacionadas aos antimicrobianos investigados (PESCIAROLI et al., 2020). Da mesma forma, genes que conferem resistência aos antimicrobianos estão presentes tanto em populações bacterianas isoladas de aves criadas em sistema orgânico quanto nas criadas em sistema convencional (HEGDE; KARIYAWASAM; DEBROY, 2016).

De acordo com Davis et al. (2018), o sistema de produção pode ter pouco efeito sobre a prevalência de resistência entre os isolados de *E. coli* de frango. Tal diferença foi significativa apenas para resistência à gentamicina e isolados multirresistentes, que foram mais elevadas em *E. coli* provenientes de sistemas de criação convencional. Quanto aos demais antimicrobianos

testados no estudo, a maior variação em prevalência de isolados resistentes foi observada entre as diferentes marcas dentro de cada sistema de produção.

A restrição do uso de antimicrobianos em produções orgânicas e livres de antimicrobiano parece não ter uma ligação clara com a redução de bactérias resistentes. Ao mesmo tempo que são encontrados estudos mostrando uma maior frequência de bactérias resistentes em sistemas convencionais quando comparados a sistemas cujo medicamento não é utilizado, outros não demonstram diferenças significativas ou demonstram diferenças pontuais entre a frequência de bactérias resistentes e os diferentes sistemas de produção (COHEN STUART et al., 2012; DAVIS et al., 2018; HEGDE; KARIYAWASAM; DEBROY, 2016; MILLMAN et al., 2013; MIRANDA et al., 2008b; ROSSA et al., 2013).

2.7 Metagenômica

A comparação de bactérias de diferentes grupos de amostras não é uma tarefa fácil. Durante muito tempo tal comparação foi realizada por testes fenotípicos, a exemplo da determinação de perfis de resistência a antimicrobianos, ou mesmo com ferramentas moleculares como amplificação e sequenciamento de genes específicos ou eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Nesses casos, a necessidade de cultivo prévio de micro-organismos pode ser vista como uma limitação dessas ferramentas quando da sua aplicação em amostras complexas e populações bacterianas. Tal limitação se dá ao fato de que muitos micro-organismos presentes nessas amostras necessitariam de condições específicas para seu cultivo, sendo considerados, muitas vezes, como não cultiváveis.

Neste sentido, abordagens de sequenciamento de última geração (NGS) podem ser utilizadas tanto para o sequenciamento de genoma completo (WGS) de bactérias isoladas, quanto para o sequenciamento de amostras complexas. A partir do sequenciamento do genoma total de amostras complexas, denominado metagenômica, é possível a identificação do DNA de, praticamente, todos os micro-organismos presentes nessas amostras o que faz com que esta técnica, aliada a abordagens de bioinformática, possa substituir as técnicas de tipagem e caracterização microbiana uma vez que fornece respostas mais rápidas e precisas (JAGADEESAN et al., 2019).

Pesquisas metagenômicas têm sido uma ferramenta útil para a verificação das alterações da microbiota e de resistoma de diferentes tipos de amostras submetidas a ações antrópicas ou naturais, tais como o uso ou restrição de antimicrobianos, desenvolvimento de novas substâncias de controle bacteriano, monitoramento da contaminação em etapas de

processamento de alimentos, fontes alimentares, entre outros (AE KIM et al., 2017; COSTA et al., 2017; HENDRIKSEN et al., 2019; JAGADEESAN et al., 2019; LIRA et al., 2020; MUNK et al., 2018; PÄRNÄNEN et al., 2018; VAN GOMPEL et al., 2020; VIKRAM et al., 2017). Inicialmente, os estudos de microbiota utilizavam a abordagem de sequenciamento alvo específico, sendo fragmentos do gene 16S rRNA o principal marcador para a identificação da microbiota bacteriana. Atualmente, estudos têm se utilizado da abordagem *shotgun* na qual o sequenciamento é realizado sem um alvo específico possibilitando, além da determinação da microbiota, a pesquisa de outros elementos como os relacionados ao resistoma (BORDA-MOLINA; SEIFERT; CAMARINHA-SILVA, 2018; HENDRIKSEN et al., 2019; VAN GOMPEL et al., 2020).

No que se refere ao monitoramento da resistência bacteriana, a diversidade e abundância de genes de resistência a antimicrobianos podem ser caracterizadas e compreendidas a partir da determinação do resistoma e do microbioma. Van Gompel et al. (2020), utilizando este tipo de abordagem observaram diferenças na composição do resistoma fecal de trabalhadores de fazendas e abatedouros de suínos e aves, sugerindo que o contato direto ou indireto com esses animais pode ser um determinante para o transporte de genes de resistência a antibacterianos para humano. Utilizando metodologia similar, Munk et al. (2018) ao avaliarem resistomas de suínos e granjas avícolas de nove países europeus observaram diferenças de abundância e composição nos resistomas das duas espécies. Além disso, entre as observações dos pesquisadores estão elencadas, além da detecção de genes responsáveis pela determinação de resistência a antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana, como *mcr-1*, o nível total de resistência a antimicrobianos foi associado ao uso geral de antimicrobianos específicos na produção e que países com padrões de uso comparáveis tinham resistomas semelhantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a diferença de perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em microbiota de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

3.2 Específicos

a) Determinar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos em *E. coli* isoladas de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

b) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC), MIC₅₀ (concentração mínima capaz de inibir 50% dos isolados) e MIC₉₀ (concentração mínima capaz de inibir 90% dos isolados) de antimicrobianos utilizados historicamente na produção animal (ampicilina e tetraciclina) ou que sejam classificados como prioritários para a saúde humana, em *E. coli* isoladas de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

c) Investigar a presença de fenótipos de cepas bacterianas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em *E. coli* isolada de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

d) Determinar o resistoma de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

e) Determinar o metarresistoma de carcaças de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

f) Investigar a composição bacteriana, segundo classificação taxonômica, presente em lavados de frangos congelados adquiridos no comércio, provenientes de produções convencionais e de produções orgânicas e livres de antimicrobianos certificadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Realizou-se um estudo descritivo comparativo do perfil genotípico e fenotípico de resistência a antimicrobianos na microbiota de frangos congelados adquiridos no comércio. Os frangos congelados adquiridos foram agrupados de acordo com a proveniência informada na embalagem em relação ao uso de antimicrobianos durante a criação dos animais, como segue:

1. proveniente de sistemas de produção convencional (GC) - sem restrição no uso de antimicrobianos como promotores de crescimento ou terapêutico;
2. provenientes de sistemas de produção livres de antimicrobianos (GL) - nos quais não é admitido o uso de antimicrobianos em nenhuma das etapas de produção;
3. provenientes de sistemas de produção orgânicos (GO) - cujo uso de antimicrobianos é restrito. Foram incluídos nos grupos 2 e 3 apenas frangos congelados, cujo *status* em relação ao uso de antimicrobianos tinha selo de certificação por entidade reconhecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estampada na embalagem. Portanto, no grupo GO, a presença dos selos revela que as carcaças investigadas foram produzidas sem uso de ATBs.

Para a determinação do tamanho amostral foi realizado um estudo piloto no qual foram analisados 33 frangos congelados (10 de cada um dos grupos GC e GO e 13 do grupo GL) adquiridos no comércio. Para a determinação do perfil de suscetibilidade foram selecionados três isolados de *Escherichia coli* provenientes de cada carcaça os quais foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à tetraciclina e ao ácido nalidíxico, conforme descrito em CLSI, 2018.

A partir dos resultados do estudo piloto (Apêndice A-C) definiu-se que seriam necessários 72 isolados de *E. coli* de cada grupo, considerando um poder de 80%, para detectar a diferença entre os grupos. Frente a esses resultados, e seguindo a metodologia utilizada no estudo piloto, na qual cada amostra de frango participou com três isolados, foi definido que a amostra seria composta por 24 frangos congelados de cada grupo (GC, GL e GO) selecionando-se, preferencialmente, três isolados de *E. coli* de cada uma das amostras.

Foram incluídos neste estudo frangos congelados disponíveis em estabelecimentos comerciais de venda direta ao consumidor. Sendo adquiridos frangos inteiros congelados e embalados na indústria, com ou sem miúdos, de acordo com a disponibilidade nos pontos de venda, tendo-se o cuidado, sempre que possível, de adquirir amostras de datas de produção distintas, considerando-as de lotes distintos. Os estabelecimentos comerciais foram

selecionados por conveniência levando-se em consideração a disponibilidade dos produtos e acesso aos pontos de venda.

4.2 Processamento das amostras de frango congelado

Os frangos congelados foram transportados em recipiente isotérmico até o laboratório onde foram armazenados sob refrigeração até seu completo descongelamento. Drenado o excesso de líquido do degelo e removidos os miúdos, quando existentes, as amostras foram transferidas para embalagens estéreis a fim de serem pesadas e submetidas à lavagem conforme recomendado pela ISO 17604 (SILVA et al., 2010).

Para a lavagem, foram adicionados a cada frango 400 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) realizando-se a homogeneização deste material durante um minuto de forma que o diluente entrasse em contato com toda a superfície interna e externa da amostra. Na sequência, o líquido resultante foi transferido para recipiente estéril e serviu de base para as análises subsequentes compostas de quatro etapas:

- i) enumeração de coliformes totais e *E. coli*;
- ii) isolamento de *E. coli*, considerada como indicador para pesquisa fenotípica de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos,
- iii) pesquisa da presença de *E. coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL);
- iv) análises de metagenômica e demais análises moleculares aplicadas ao DNA total das amostras.

4.3 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

A enumeração de coliformes totais e *E. coli* foi realizada a partir de diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-6}) do líquido obtido da lavagem da carcaça. A partir das diluições, alíquotas de um mL foram semeadas em profundidade, em duplicata, em placas contendo ágar cromogênico para *E. coli* (Chromocult Coliform Agar, Merck), conforme instruções do fabricante. Após incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h, procedeu-se a contagem das colônias, considerando-se como coliformes as colônias vermelho-salmão, enquanto colônias azuis escuras a violeta foram indicativas de *E. coli*. O somatório dos dois tipos morfológicos representou a quantidade de coliformes totais presentes em cada amostra.

4.4 *Escherichia coli* como indicador de resistência a antimicrobianos

4.4.1 Formação do grupo de isolados de *E. coli* provenientes de frangos congelados de GC, GL e GO

O grupo de isolados de *E. coli* foi formado, preferencialmente, por três colônias de cada amostra de frango, obtidas como a partir das placas de ágar Chromocult (descrito no item 4.3) ou, no caso de não existirem colônias características de *E. coli* suficientes nesse meio (< 3 colônias), os isolados foram selecionados a partir do caldo de enriquecimento. Nesse caso, 30 mL do caldo de lavagem foram inoculados em 30 mL de APT 1%. Após incubação a 36°C ±1 °C por 18-24h, foram realizadas diluições seriadas do caldo de enriquecimento, seguida de isolamento em ágar diferencial (Chromoagar - DIFCO). Após incubadas a 36°C±1 °C por 18-24 horas, colônias, morfologicamente compatíveis com *E. coli* foram selecionadas em quadrantes distintos da placa propiciando a escolha de populações diferentes. Em ambos os casos, cada colônia fenotipicamente característica de *E. coli* foi semeada em ágar não seletivo, para confirmação fenotípica da espécie conforme descrito por Quinn et al. (2011). Isolados que apresentaram teste fenotípico atípico como, por exemplo, motilidade negativa, foram confirmados a partir da técnica de espectrometria de massa (MALDI-ToF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). Após confirmação, as bactérias foram armazenadas em *skim milk* (Acumedia) com glicerol, a -20 °C até sua utilização nos testes de suscetibilidade e demais análises moleculares. Na inexistência de colônias típicas de *E. coli* em alguma unidade amostral, colônias adicionais foram selecionadas das amostras positivas até a obtenção de 72 colônias por grupo (GC, GL e GO).

4.4.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *E. coli*

O perfil fenotípico de resistência foi realizado a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), bem como de teste de disco difusão em ágar. A escolha dos antimicrobianos testados foi baseada na importância de seu uso em medicina humana e a utilização em medicina veterinária, seguindo o painel determinado pela *Commission Implementing Decision 2013/652/EU* (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL 2017).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, como preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI,

2020), em placas de 96 poços frente aos seguintes antimicrobianos (Sigma-Aldrich, EUA): ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP), colistina (COL), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET).

A escolha do intervalo de concentrações testadas e dos pontos de corte microbiológico e epidemiológico (ECOFF - *epidemiological cutoff*) utilizados na interpretação dos resultados (Tabela 2) seguiu as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e CLSI 2020 levando em consideração, também, as MICs da cepa controle, além dos dados já obtidos no estudo piloto.

Tabela 2 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações utilizadas e valores de ECOFF e de *breakpoint* de resistência.

| Antimicrobiano | Concentrações (mg/L) | ECOFF (mg/L) | Breakpoint (mg/L) | |
|------------------|----------------------|--------------|-------------------|------|
| | | | EUCAST | CLSI |
| Ácido Nalidíxico | 0,5-512 | 8 | NA | ≥32 |
| Ampicilina | 0,5-512 | 8 | > 8 | ≥32 |
| Cefotaxima | 0,015-32 | 0,25 | > 2 | ≥4 |
| Ciprofloxacina | 0,004-8 | 0,064 | > 0,5 | ≥1 |
| Colistina | 0,06-16 | 2 | >2 | ≥4 |
| Gentamicina | 0,125-64 | 2 | > 2 | ≥16 |
| Tetraciclina | 0,25-256 | 8 | - | ≥16 |

(NA) não aplicável; (-) sem breakpoint; ECOFF: ponto de corte epidemiológico; *Breakpoint*: ponto de corte clínico; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Para preparação das soluções estoque, foram adotados os solventes e diluentes recomendados pelo CLSI M100S (CLSI, 2020), ou conforme instruções dos fabricantes. As concentrações das soluções estoques foram equivalentes a dez vezes a concentração mais alta a ser testada e de pelo menos 1000 mg/L.

As concentrações dos antimicrobianos foram obtidas através de diluições seriadas das soluções estoque, em caldo *Mueller Hinton* cátion ajustado (CAMBH - BD). O caldo CAMBH, já acrescido de antimicrobiano, foi distribuído em ordem crescente de concentração nos poços, com um volume final de 90 µL. Posteriormente, foram adicionados os isolados a serem testados em uma concentração de 5×10^4 UFC por poço.

Para obtenção da concentração final de cada isolado, foram utilizadas culturas de 18 horas e, a partir destas, os isolados foram ajustados visualmente até turvação equivalente a 0,5 da escala de *MacFarland* – correspondente a 1×10^8 UFC/mL. Após, foi realizada diluição 1:20 para atingir uma concentração de 5×10^6 UFC e, desta, foram transferidos 10 µL para os poços contendo 90 µL de caldo CAMBH já acrescido de antimicrobiano, resultando em concentração

final de 5×10^5 UFC por mililitro, ou ainda, 5×10^4 UFC por poço. As placas foram seladas com para-filme e incubadas a 35 ± 2 °C por 16-20 horas.

Como controle negativo, poços da placa de teste foram preenchidos com 90 µL de CAMBH sem antimicrobiano e sem inóculo. Cada isolado em teste foi inoculado em CAMBH sem antimicrobiano, para certificar sua capacidade de crescimento bacteriano (controle positivo). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi inoculada como controle de qualidade do teste. O controle das suspensões bacterianas foi realizado, periodicamente, a partir da contagem em placa das suspensões da cepa *E. coli* ATCC 25922.

Transcorrido o período de incubação, as placas foram examinadas visualmente e a menor concentração de um dado antimicrobiano na qual não foi observado crescimento bacteriano (turvação) foi considerada a concentração inibitória mínima (MIC) do antimicrobiano para o isolado testado. Quando não foi possível determinar o MIC com as concentrações propostas (bactéria com crescimento na maior concentração aplicada), os testes foram repetidos com até duas concentrações subsequentes de antimicrobianos na tentativa de definir qual a concentração capaz de inibir o crescimento daquele isolado.

Os antimicrobianos ceftazidima - CAZ (30µg), cloranfenicol - CLO (30 µg), meropenem – MER (10 µg), tigeciclina – TIG (15 µg) e trimetoprim - TRI (5 µg) foram testados pelo protocolo de disco difusão em ágar (CLSI, 2018, 2020), sendo os perfis de suscetibilidade interpretados conforme Tabela 3. A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade para os testes realizados.

Tabela 3 – Antimicrobianos testados por disco difusão, concentrações utilizadas e valores de ECOFF e de *breakpoint* de resistência.

| Antimicrobiano | Concentração do disco (µg) | ECOFF (mm) | <i>Breakpoint</i> (mm) | |
|----------------|----------------------------|------------|------------------------|------|
| | | | EUCAST | CLSI |
| Ceftazidima | 30 | 20 | - | ≤17 |
| Cloranfenicol | 30 | 17 | ≥17 | ≤12 |
| Meropenem | 10 | 25 | <16 | ≤19 |
| Tigeciclina | 15 | 18 | <18 | - |
| Trimetoprim | 5 | 20 | <15 | ≤10 |

ECOFF: Epidemiological cut-off. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

(-) sem breakpoint; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Os resultados obtidos em laboratório foram tabulados em planilhas eletrônicas utilizando-se o programa Excel (Microsoft, EUA), sendo adaptadas ou exportadas para os programas de análises estatística quando necessário.

O programa Excel também foi a ferramenta utilizada para a determinação da MIC₅₀ (concentração mínima capaz de inibir 50% dos isolados) e da MIC₉₀ (concentração mínima capaz de inibir 90% dos isolados).

A diferença da frequência de isolados resistentes aos antimicrobianos nos diferentes grupos (GC, GL e GO) foi calculada utilizando-se análise de variância (ANOVA) conforme descrito por (MILLMAN et al., 2013). Como medida de associação para verificar a relação da resistência a antimicrobianos entre os diferentes grupos de produção foi utilizado o modelo de regressão de Poisson a partir do cálculo de Razão de Prevalência (RP). Para tanto, foi utilizado o *software* R com os pacotes *epitools* e *stat*. Para este cálculo o grupo de produção convencional GC foi considerado como base a ser comparado com os demais grupos GL e GO.

4.5 Pesquisa de *E. coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido - ESBL

A pesquisa de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foi realizada de acordo com o protocolo elaborado pela *European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance* (EFSA, 2019; EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2017; HASMAN et al., 2018). Inicialmente procedeu-se o pré-enriquecimento não seletivo da amostra, inoculando-se 30 mL do caldo de lavagem das carcaças em 30 mL de água peptonada tamponada (APT) 1%. Após incubação a 37 °C ± 1 °C por 18-22h, 10 uL do caldo de pré-enriquecimento foi semeado por esgotamento em ágar *MacConkey* suplementado com 1 mg/L de cefotaxima (ágar CTX). As placas foram então incubadas a 44 °C ± 0.5 °C por 18-22h. Posteriormente, até três colônias fenotipicamente características de *E. coli* (lactose positiva) e até três colônias não características de *E. coli* (lactose negativa) foram subcultivadas em ágar CTX, para a obtenção de colônias isoladas, sendo as placas incubadas a 37 °C ± 1 °C por 18-22h. Uma colônia isolada de cada subcultivo foi semeada em ágar Triptona de Soja (TSA) para identificação fenotípica da espécie conforme descrito por Quinn et al. (2011) e realização dos testes confirmatórios da presença de beta-lactamases de espectro estendido.

4.5.1 Teste presuntivo para a pesquisa de bactérias produtoras de ESBL

O teste presuntivo para pesquisa da presença de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido foi realizado por disco difusão em ágar (CLSI, 2018; EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2017).

Colônias de cada isolado com até 24h de cultivo em TSA foram transferidas para solução salina 0,85% até uma concentração de 0,5 na escala *McFarland* e semeadas na superfície de ágar Muller-Hinton (Oxoid). A seguir, discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefoxitin 30 µg e meropenem (10 µg) (Oxoid) foram depositados na superfície do ágar e as placas incubadas a 34 ± 1 °C por 18-24h. Após incubação, foi realizada a medição dos halos de inibição sendo considerados presuntivos positivos para a presença de ESBL os isolados que apresentaram perfil de resistência a cefotaxima e/ou ceftazidima, conforme Tabela 4. Tais isolados foram submetidos ao teste confirmatório pelo protocolo de sinergia em duplo disco (EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2017).

Além das duas cefalosporinas de 3º geração (cefotaxima e ceftazidima) utilizadas para o teste presuntivo para prever a produção de ESBL, outros antimicrobianos foram acrescentados ao painel de teste para aumentar a especificidade da análise. O antimicrobiano cefoxitina foi utilizado como um preditor para a enzima AmpC, uma vez que isolados produtores desta enzima apresentam resistência a este antimicrobiano. Além disso, meropenem foi utilizado para predição ou triagem de bactérias produtoras de carbapenemases (EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2017).

Tabela 4 – Antimicrobianos testados por disco difusão para o teste presuntivo da presença de ESBL e carbapenemases, concentrações utilizadas e valores de ponto de corte de triagem.

| Antimicrobiano | Concentração (µg) | Halo de inibição positivo na triagem |
|-------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Cefotaxima (CTX) | 30 | ≤ 27mm |
| Ceftazidima (CAZ) | 30 | ≤ 22mm |
| Cefoxitina (CFO) | 30 | < 19mm* |
| Meropenem (MER) | 10 | ≤ 19mm |

* EUCAST, 2017.

4.5.2 Teste fenotípico para a confirmação de bactérias produtoras de ESBL

Para confirmação de bactérias produtoras de ESBL foi utilizado o protocolo de sinergia de disco duplo. Para tanto, cultivos bacterianos de cada isolado considerado positivo no teste presuntivo foram transferidos para solução salina 0,85% até uma concentração de 0,5 na escala *McFarland* e semeadas na superfície de ágar Muller-Hinton (Oxoid). Ao centro da placa foi

colocado um disco contendo amoxicilina+ácido clavulânico (20 µg/10 µg) (AMC) e ao redor, com distância de 20 mm do centro do disco central, foram adicionados os discos de cefotaxima e ceftazidima. Foram considerados positivos os isolados cujo halo de inibição, de qualquer uma das cefalosporinas testadas, apresentasse aumento em direção ao disco central de AMC ou, ainda, apresentasse uma “descontinuidade” no halo de inibição em direção ao disco contendo ácido clavulânico.

Para a detecção, ou diferenciação, da produção de AmpC plasmidial (pAmpC) o mesmo teste foi realizado substituindo-se o disco central por cloxacilina, uma vez que pAmpC é inibida por este antimicrobiano (EFSA, 2019).

4.5.3 Determinação do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos em *E. coli* produtora de ESBL

Todas as cepas de *E. coli* com fenótipo positivo para ESBL e ESBL/pAmpC foram submetidas à determinação do perfil de resistência a antimicrobianos. Colônias de cada isolado com 18-24h de cultivo em TSA (Oxoid) foram transferidas para solução salina 0,85% até uma concentração de 0,5 na escala *McFarland* e semeadas na superfície de ágar Muller-Hinton (Oxoid). Discos de antimicrobianos (Sensifar), representando 12 categorias distintas (MAGIORAKOS et al., 2012) (Tabela 5) foram depositados na superfície do ágar e as placas incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18-24h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo realizado de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI, 2020). A determinação de MIC foi realizada para os antimicrobianos colistina e ácido nalidíxico.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS Statistics (IBM). A escolha de cada teste levou em consideração o tipo de estudo (transversal), as características da variável estudada e o tipo de resposta a ser buscada. Para variáveis com distribuição não normal no teste de *Shapiro-Wilk* os testes utilizados foram os não-paramétricos como, por exemplo, *Kruskal-Wallis*.

Tabela 5 – Lista dos antimicrobianos testados apresentando as categorias e concentrações.

| Antimicrobianos | Concentração (µg) |
|--|--------------------------|
| <i>Cefamicina</i> | |
| Cefoxitin (FOX) | 30 |
| <i>Cefalosporina 3^a e 4^a geração</i> | |
| Ceftiofur (CTF) | 30 |
| Cefotaxima (CTX) | 30 |
| Ceftazidima (CAZ) | 30 |
| Cefepime (FEP) | 30 |
| <i>Penicilinas + inibidor de β-lactamase</i> | |
| Amoxicilina-clavulanato (AMC) | 20/10 |
| <i>Carbapenêmico</i> | |
| Meropenem (MEN) | 10 |
| <i>Fenicol</i> | |
| Cloranfenicol (CLO) | 30 |
| <i>Tetraciclina</i> | |
| Doxiciclina (DOX) | 30 |
| Tetraciclina (TET) | 30 |
| <i>Aminoglicosídeos</i> | |
| Amicacina (AMI) | 30 |
| Gentamicina (GEN) | 10 |
| Neomicina (NEO) | 30 |
| <i>Nitrofurano</i> | |
| Nitrofurantoína (NIT) | 300 |
| <i>Inibidores da via do folato</i> | |
| Sulfametaxazol-trimetoprima (SUT) | 25 |
| <i>Quinolona</i> | |
| Ácido Nalidíxico (NAL) | *0,5 a 512 mg/mL |
| <i>Fluoroquinolonas</i> | |
| Ciprofloxacina (CIP) | 5 |
| Enrofloxacina (ENO) | 5 |
| <i>Polimixina</i> | |
| Colistina (COL) | *0,06-16 mg/mL |

(*) intervalo de concentrações utilizadas no teste de microdiluição em caldo.

4.6 Avaliação do perfil genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* produtores de ESBL

4.6.1 Seleção dos isolados para caracterização genômica

Para o perfil genotípico de resistência de *E. coli* produtoras de ESBL foram selecionados 24 isolados, oito de cada grupo, com fenótipo positivo para a produção de ESBL, conforme descrito no item 4.5.2. O perfil fenotípico de resistência foi utilizado como critério de inclusão. Foram incluídos, então, os isolados de carcaças distintas que apresentaram resistência ao maior número de antimicrobianos testados.

4.6.2 Extração de DNA

O DNA total de cada isolado foi extraído através do kit MagMax™ (Applied Biosystems™). A partir de culturas de 18-24 horas de crescimento em ágar TSA (Oxoid) a 36 ± 1 °C foram preparadas suspensões bacterianas em 1 mL de solução salina (0,85%) de modo a se obter um padrão de turbidez referente a 6 da escala de *MacFarland* (2×10^9 bactérias). Essa suspensão foi transferida para microtubos estéreis que foram centrifugados a $14.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente para formação do *pellet* bacteriano. Em seguida o *pellet* foi ressuspenso em 500 μ L de solução salina e submetido à centrifugação $14.000 \times g$ por um minuto. Após remoção do sobrenadante o *pellet* bacteriano foi ressuspenso em 200 μ L de tampão fosfato (PBS). A sequência da extração do DNA total de cada um dos isolados foi realizada conforme instruções do fabricante com adaptações. Realizada a extração, foi verificada a concentração e qualidade do DNA através de fluorometria (quantificador Quantus™ Fluorometer, Promega) e espectrofotômetro de microvolume (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), respectivamente. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%), utilizando o marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). Os DNA extraídos foram armazenados a -20 °C até o momento do preparo das bibliotecas para sequenciamento genômico.

4.6.3 Sequenciamento do genoma total de *E. coli*

Os DNAs dos isolados de *E. coli* com alto grau de pureza e integridade, na concentração de 0,2 ng/mL, foram utilizados para o sequenciamento do genoma. As bibliotecas foram preparadas utilizando o kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após a fragmentação dos DNAs, esses foram identificados com diferentes sequências de DNA (índice) com o Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina). O sequenciamento do genoma total foi realizado na plataforma Illumina, utilizando o Illumina MiSeq System. As bibliotecas foram sequenciadas em sistema *multiplex* com o kit MiSeq v2 Reagent (2x250 nt), considerando uma cobertura calculada (https://support.illumina.com/downloads/sequencing_coverage_calculator.html) de 60 vezes e um genoma de 5 Gb, ou seja, 24 amostras por *flow cell*.

4.6.4 Montagem, anotação e pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

A qualidade das sequências obtidas a partir de cada biblioteca foi verificada utilizando o *software* FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequências de baixa qualidade ou fragmentos de sequências de baixa qualidade foram eliminados com o *software* Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). As sequências foram montadas em *contigs* com o *software* SPAdes v. 3.11 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade da montagem, bem como estatísticas de montagem foram avaliadas utilizando o servidor Quast (<http://quast.bioinf.spbau.ru/>). Após a montagem, os *contigs* foram anotados de forma automática utilizando o *software* PROKKA (<https://github.com/tseemann/prokka>).

Os *contigs* gerados para cada isolado foram verificados quanto à presença de genes de resistência a antimicrobianos a partir do banco de dados Comprehensive Antibiotic Resistance Database CARD (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) considerando um ponto de corte 95% de identidade a nível de aminoácidos para a identificação dos genes. Foi realizada aferição manual nos genes de resistência aos betalactâmicos e do gene *qnr* nos *contigs* anotados para verificar sua correspondência com plasmídeos. Esses *contigs* foram analisados utilizando-se o BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A detecção de plasmídeos foi realizada pela plataforma PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). As ferramentas *online* SeroTypeFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) e MLST (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) foram utilizadas para a determinação dos sorotipos e das STs dos isolados, respectivamente. A determinação dos grupos filogenéticos foi realizada de acordo com Clermont et al., (2013) utilizando-se a ferramenta disponível em <https://ezclermont.hutton.ac.uk/>.

A análise filogenética foi realizada conforme Kaas et al. (2014), utilizando o alinhamento pela plataforma <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/> e a cepa referência *E. coli* K-12 (GenBank PRJNA225).

4.7 Avaliação da população e de genes de resistência a antimicrobianos em lavados de carcaças de frangos – Metagenômica e Metarresistoma

4.7.1 Extração de DNA

O DNA total das amostras foi obtido a partir do lavado de cada carcaça, conforme descrito no item 4.2. Para tanto, duas alíquotas de 40 mL do caldo inicial (400 mL) foram transferidas para tubos cônicos estéreis com capacidade para 50 mL. Para remoção de partículas

maiores e debris celulares, este material foi filtrado em duas etapas: inicialmente utilizando-se membrana de 70 μm (FALCON®) e, posteriormente, com o auxílio de bomba de vácuo o material foi novamente filtrado utilizando-se uma membrana 8 μm (MF-Millipore™). Para a formação do *pellet* celular, após o processo de filtração o material foi centrifugado a 1.735 x g durante 30 minutos a 4 °C (Rotina 380R Hettich™) também em duas etapas. Procedeu-se a centrifugação da primeira alíquota, descartou-se o sobrenadante, acrescentou-se o conteúdo da segunda alíquota procedendo-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de solução tampão fosfato (PBS) e transferido para microtubos estéreis dando sequência ao protocolo de extração.

Para a redução de DNA contaminante (do hospedeiro), após ressuspensão, a amostra foi centrifugada a 8.000 x g durante 10 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados então 450 μl de água ultrapura estéril, 45 μL de tampão 10 x DNase (Tris-HCl/MgCl₂) e 5 μL de DNase (28 U/ μL Sigma) seguindo de incubação a 37°C por uma hora e inativação da DNase incubando-se a 65°C por 10 min.

Essa etapa foi seguida de uma nova centrifugação a 8000 x g durante 10 min, dando sequência à etapa de lise celular bacteriana. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensão em 350 μl de tampão de lise (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, Triton x100) acrescido de lisozima (20mg/mL) e 30 μL de lisostafina (1mg/mL, Sigma). Após incubação em banho-maria a 36 °C por 12-18h, procedeu-se mais uma centrifugação a 8.000 x g durante 10 min descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi suspenso em 400 μL de tampão PBS. Duzentos microlitros dessa suspensão foram utilizados para a extração de DNA total por meio de kit Magmax™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems™) seguindo as orientações do fabricante com pequenas adaptações.

Realizada a extração, foram verificadas a concentração e qualidade do DNA através do quantificador Quantus Fluorometer (Promega) e NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), respectivamente. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,5%). Os DNA isolados foram armazenados a -20 °C.

4.7.2 Sequenciamento de alto desempenho

Para as pesquisas de metagenômica as 24 amostras de DNA de cada grupo (GC, GL e GO) foram agrupadas em quatro *pools* de seis amostras. As bibliotecas foram preparadas utilizando o kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após a fragmentação dos DNAs, esses foram

identificados com diferentes sequências de DNA (índice) com o Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina). O tamanho dos fragmentos foi avaliado pelo sistema automatizado de eletroforese capilar (Fragment Analyzer). O sequenciamento do metagenoma total foi realizado na plataforma Illumina, utilizando o Illumina MiSeq System. As bibliotecas foram sequenciadas em sistema *multiplex* com o kit MiSeq v2 Reagent (2x250 nt). Foram realizados três sequenciamentos distintos, selecionando-se de forma aleatória os 4 *pools* para serem sequenciados em cada “rodada”.

4.7.3 Análise da qualidade das sequências e montagem do metagenoma

O programa FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) foi utilizado para verificar a qualidade das sequências geradas. Após a avaliação da qualidade, o metagenoma foi montado utilizando-se o programa MetaSPAdes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411777/>) a partir dos parâmetros padrões do programa. Uma vez que a qualidade das sequências geradas foi relativamente alta, nenhum corte de qualidade foi realizado. As montagens dos metagenomas foram realizadas na plataforma Galaxy 20,05 (<https://usegalaxy.org/>).

4.7.4 Filtragem das sequências relacionadas ao hospedeiro

As sequências *paired-end* foram alinhadas frente ao genoma referência do hospedeiro (*Gallus gallus galGal4*) utilizando-se a ferramenta Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). Após o alinhamento, as sequências mapeadas, ou seja, derivadas do hospedeiro, foram subtraídas das análises subsequentes.

4.7.5 Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos e elementos genéticos móveis (metarresistoma e mobiloma)

A caracterização do metarresistoma foi realizada a partir do mapeamento das sequências contra o banco de dados The Comprehensive Antibiotic Resistance Database - CARD 3.1.0. Após download do banco, disponível em <https://card.mcmaster.ca/download> (acesso em 10 de setembro de 2020), realizou-se o mapeamento dos genes de resistência utilizando-se o programa Bowtie2, conforme descrito por Pärnänen et al. (2018).

A caracterização do mobiloma foi realizada conforme descrito por Pärnänen, K. et al. (2018), realizando-se o mapeamento das leituras metagenômicas frente a um banco de dados abrangente não redundante composto por dados de elementos genéticos móveis (MGE) com 278 anotações de nomes de genes diferentes e mais de 2.000 sequências exclusivas. O banco de dados MGE utilizado para esta caracterização está disponível em <https://github.com/KatariinaParnanen/MobileGeneticElementDatabase>.

As leituras do mapeamento foram ajustadas conforme o número total de sequências geradas, após a subtração de sequências relacionadas ao genoma do hospedeiro, e o tamanho de cada gene utilizando-se a abordagem FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*).

A diversidade de genes de resistência (diversidade alfa) foi calculada utilizando-se os índices de Simpson (1-D) e Shannon sendo que cada grupo de produção foi considerado como uma comunidade distinta. O perfil de genes de resistência, foi analisado descritivamente por grupo e entre os grupos, verificando-se as características intra e inter grupos.

4.7.6 Caracterização da comunidade bacteriana encontrada nos lavados

A comunidade bacteriana foi caracterizada utilizando-se o software Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019). Esta ferramenta utiliza alinhamentos exatos de k-mers para a classificação das sequências metagenômicas. Os dados gerados após o alinhamento das sequências para classificação taxonômica pelo Kraken2 foram analisados a partir da ferramenta Pavian Metagenomics Data Explorer (BREITWIESER; SALZBERG, 2020), disponível em <https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras e enumeração de *E. coli* e coliformes totais

Setenta e dois frangos inteiros congelados (Apêndice D), com selo de inspeção sanitária federal (SIF), foram adquiridos no comércio varejista, distribuídos igualmente em três origens de produção de acordo com a proveniência informada na embalagem em relação ao uso de antimicrobianos durante a criação dos animais: 24 do sistema convencional (GC), 24 com selo de certificação de proveniência de sistema livre de antimicrobianos (GL) e 24 com selo de certificação de proveniência de sistema de produção orgânica (GO). Quanto à distribuição das marcas, estiveram disponíveis nos pontos de venda, durante o período de coleta, cinco marcas do sistema de produção convencional, duas marcas do sistema livre de antimicrobianos e uma do sistema orgânico.

O peso das carcaças apresentou uma distribuição normal entre os sistemas de produção GC e GL enquanto no sistema GO a distribuição foi não normal. As medianas de peso dos grupos foi de 1.892,5g (1650,0 - 2237,5) em GC, 1.737,5g (1.650,0g - 2050,0) em GL e de 1.550,0g (1.367,5 - 1.750,0) em GO.

A carga bacteriana das amostras, considerando a enumeração de *E. coli* e coliformes totais (UFC.g⁻¹) está apresentada na Tabela 6. A contagem de coliformes totais diferiu significativamente entre GO vs GC ($p = 0,001$) e GO vs GL ($p = 0,003$), sendo maior em GO em ambas comparações. Não houve diferença significativa ($p = 1,00$) no número de coliformes totais entre os grupos GC e GL. Os grupos GC e GL apresentaram contagens de coliformes totais menor que 1 UFC.g⁻¹ em 7 (29,1%) e 2 (8,33%) amostras, respectivamente; o grupo orgânico não apresentou amostras com contagens nesta categoria. A maioria das amostras 83,3% (60/72), observando-se os três grupos, apresentou contagens de coliformes totais entre 1 e 10² UFC.g⁻¹. Apenas o grupo orgânico apresentou contagens acima de 10² UFC.g⁻¹ em três amostras.

Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,721$) entre as contagens de *E. coli* (UFC.g⁻¹) nos três grupos. Todas as amostras apresentaram contagens de *E. coli* por grama dentro dos limites microbiológicos (5×10^3) determinados pela legislação brasileira em vigor (BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b, 2019c). A maior contagem ($3,1 \times 10^2$) de *E. coli* verificada ocorreu em uma amostra do grupo GO. Vinte e sete (37,5%) amostras apresentaram contagens menor que 1 UFC.g⁻¹ de *E. coli* (sete do grupo GC, 10 do GL e 10 do GO).

Tabela 6 – Comparação da enumeração de *Escherichia coli* e coliformes totais entre os sistemas de produção. Os dados estão apresentados por mediana, mínimo e máximo.

| | GC (n=24) | GL (n=24) | GO (n=24) | p-valor(a) |
|---------------------------------------|--|--|---|------------|
| <i>E. coli</i> (UFC.g ⁻¹) | <1 (<1 – 13) | <1 (<1 – 8) | <1 (<1 - 3,1x10 ²) | 0,721 |
| CT (UFC.g ⁻¹) | 2 (<1 – 1,1x10 ²) ^a | 2 (<1 – 3,2x10 ²) ^a | 2x10 ¹ (1 – 3,2x10 ⁴) ^b | <0,001* |

CT: coliformes totais, GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antimicrobianos, GO: grupo orgânico, *E. coli*: *Escherichia coli*, UFC: unidade formadora de colônias.

Nas linhas, os valores com diferentes letras sobrescritas (^{a,b}) indicam diferenças significativas ($p \leq 0,050$) entre os grupos avaliados com base no teste de *post hoc* de Dunn-Bonferroni.

5.2 *Escherichia coli* como indicador de resistência a antibacterianos

Para as pesquisas de *E. coli* como indicador de resistência a antimicrobianos foram avaliadas 72 cepas de cada grupo de produção. Essas cepas foram testadas frente a 12 drogas antibacterianas representando 10 categorias distintas, pelas metodologias de MIC ou disco difusão. Inicialmente, seriam selecionadas três cepas de cada carcaça/amostra, porém, como em algumas carcaças não houve crescimento de colônias com características compatíveis de *E. coli*, as 72 cepas de cada grupo (total de 216 cepas) foram distribuídas entre as carcaças positivas conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Número de carcaças positivas para *E. coli* em cada grupo de produção

| | GC (n=72) | GL (n=72) | GO (n=72) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Número de carcaças positivas | 23 | 21 | 22 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antimicrobianos, GO: grupo orgânico. n: número absoluto de cepas analisadas.

A distribuição da Concentração Inibitória Mínima está apresentada na Tabela 8. Considerando o cálculo de MIC₅₀ (concentração mínima capaz de inibir o crescimento de 50% da população em estudo) pode-se observar que frente a todos os antimicrobianos testados para os três grupos de produção, esse valor se manteve abaixo do ponto de corte clínico (CLSI, 2020). Por outro lado, quando verificado o MIC₉₀ (concentração mínima capaz de inibir o crescimento de 90% da população em estudo) observou-se que para os antimicrobianos ácido nalidíxico, ampicilina e tetraciclina os três grupos de produção (GC, GL e GO) apresentaram MIC₉₀ acima dos valores do ponto de corte clínico. Além disso, o grupo GL apresentou, ainda, MIC₉₀ acima desse ponto de corte para os antimicrobianos cefotaxima e gentamicina. Enquanto o grupo GO apresentou MIC₉₀ acima do ponto de corte clínico para gentamicina.

Tabela 8 – Distribuição das cepas de *E. coli* (número absoluto) frente ao teste de Concentração Inibitória Mínima conforme antimicrobiano, concentrações testadas e grupo de amostras de frango congelado.

(Continua)

| NAL (mg/L) | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | >512 | | MIC₅₀ | MIC₉₀ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|------------|------------|------------|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| GC | 0 | 0 | 6 | 33 | 11 | 3 | 4 | 0 | 3 | 12 | 0 | 0 | | 4 | 256* |
| GL | 0 | 4 | 29 | 17 | 7 | 3 | 3 | 0 | 0 | 6 | 3 | 0 | | 4 | 256* |
| GO | 0 | 0 | 7 | 51 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | | 4 | 512* |
| AMP (mg/L) | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | >512 | | MIC₅₀ | MIC₉₀ |
| GC | 0 | 4 | 13 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 16 | 4 | | 4 | 512* |
| GL | 0 | 6 | 22 | 29 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 4 | 7 | | 4 | 512* |
| GO | 0 | 0 | 33 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 5 | | 4 | 512* |
| CIP (mg/L) | 0,004 | 0,008 | 0,015 | 0,03 | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | >8 | MIC₅₀ | MIC₉₀ |
| GC | 0 | 2 | 40 | 7 | 1 | 2 | 8 | 6 | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,015 | 0,5 |
| GL | 0 | 0 | 44 | 9 | 4 | 3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,015 | 0,25 |
| GO | 0 | 1 | 53 | 8 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0,015 | 0,5 |
| COL (mg/L) | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | | | | | MIC₅₀ | MIC₉₀ |
| GC | 0 | 0 | 0 | 49 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0,5 | 1 |
| GL | 0 | 0 | 1 | 26 | 45 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 1 | 1 |
| GO | 0 | 0 | 0 | 14 | 53 | 5 | 0 | 0 | 0 | | | | | 1 | 1 |

(Conclusão)

| CTX (mg/L) | <0,015 | 0,015 | 0,03 | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | >32 | MIC₅₀ | MIC₉₀ |
|-------------------|------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|---------------|-----------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GC | 0 | 0 | 4 | 39 | 22 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0,06 | 0,125 |
| GL | 8 | 0 | 18 | 32 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0,06 | 4* |
| GO | 0 | 0 | 10 | 47 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 | 0,06 | 0,25 |
| GEN (mg/L) | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 | | | MIC₅₀ | MIC₉₀ | |
| GC | 1 | 0 | 47 | 18 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | | | 0,5 | 1 | |
| GL | 0 | 0 | 29 | 21 | 4 | 0 | 0 | 0 | 12 | 5 | 1 | | | 1 | 32* | |
| GO | 0 | 2 | 23 | 36 | 0 | 0 | 0 | 8 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 16* | |
| TET (mg/L) | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | | | | |
| GC | 0 | 1 | 26 | 17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 19 | 3 | | | 2 | 128* | |
| GL | 0 | 0 | 16 | 31 | 0 | 0 | 0 | 1 | 13 | 8 | 3 | | | 2 | 128* | |
| GO | 0 | 0 | 8 | 33 | 13 | 0 | 0 | 5 | 0 | 6 | 7 | | | 2 | 128* | |

Ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), colistina (COL), cefotaxima (CTX), gentamicina (GEN), tetraciclina (TET).

MIC₅₀ e MIC₉₀ representam os valores das concentrações mínimas (mg/L) necessárias para inibir o crescimento de 50% e 90%, respectivamente, das cepas testadas, considerando um inóculo de 10⁵ unidades formadoras de colônias (UFC).

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antimicrobianos, GO: grupo orgânico.

Células preenchidas de cinza representam valores de breakpoint clínico segundo CLSI. Linha tracejada na vertical indica o valor de ECOFF (ponto de corte epidemiológico).

(*) valores encontram-se acima dos valores de ponte de corte clínico.

Verificando-se o ponto de corte epidemiológico (ECOFF) as cepas apresentaram comportamento semelhante ao verificado no ponto de corte clínico no que se refere ao MIC₅₀, permanecendo todos os grupos abaixo do ponto de corte epidemiológico nos três grupos. Quanto à MIC₉₀, os três grupos apresentaram valores acima ou igual ao ECOFF frente aos antimicrobianos ácido nalidíxico, ampicilina, ciprofloxacina e tetraciclina. Os grupos GL e GO apresentaram, ainda, MIC₉₀ superior ou igual ao ECOFF frente à cefotaxima e à gentamicina.

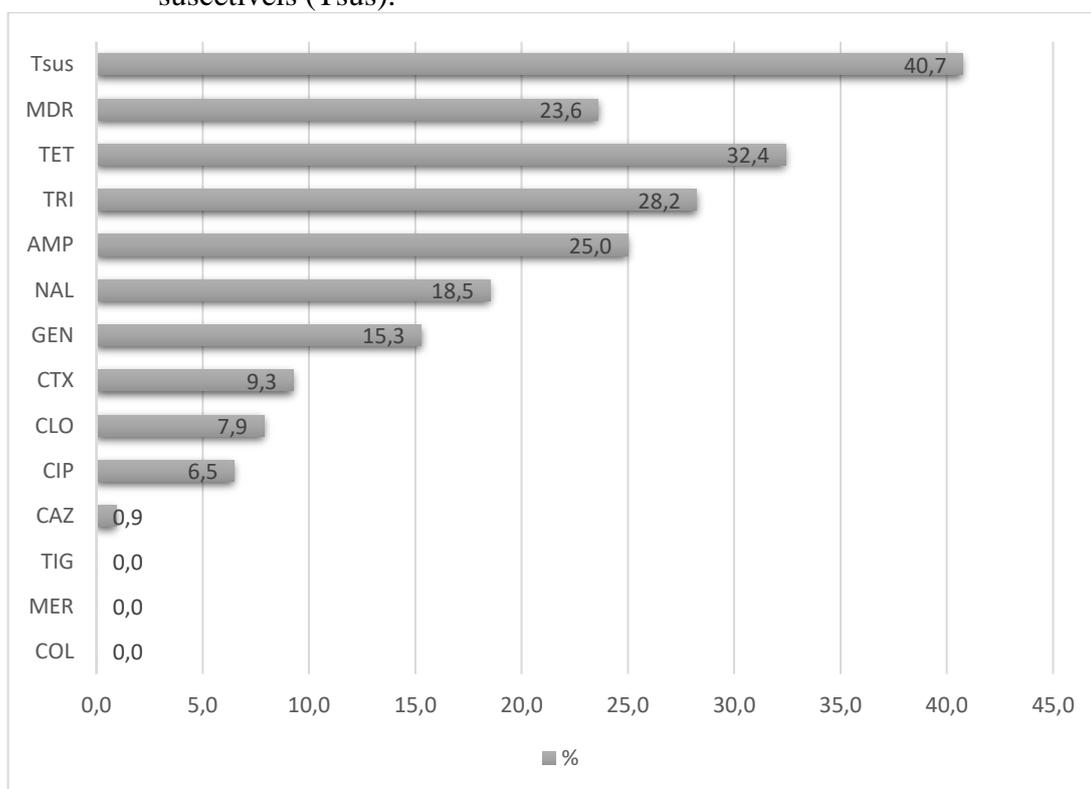
Quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, dos 216 isolados analisados, 128 (59,2%) apresentaram resistência a pelo menos um, dos 12 antimicrobianos testados, 51 (23,6%) cepas apresentaram perfil de multirresistência, considerando resistência a 3 ou mais antimicrobianos de categorias distintas (MAGIORAKOS et al., 2012) (Tabela 9). Duas cepas, provenientes de uma mesma carcaça, apresentaram resistência a sete antimicrobianos de categorias distintas. Essas cepas multirresistentes foram as que apresentaram o maior número de resistência aos antimicrobianos testados tendo o seguinte perfil de resistência: NAL-AMP-CIP-CTX-TET-CLO-TRI.

Tabela 9 – Distribuição das cepas resistentes em grupos de amostras de frango congelado de acordo com o número de categorias de antimicrobiano em que houve resistência

| Grupo | Número de categorias antimicrobianas | | | | | | | Total de cepas resistentes |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Convencional (GC) | 17 | 8 | 16 | 2 | 4 | 1 | 0 | 48 |
| Livre de antibióticos (GL) | 15 | 16 | 9 | 3 | 3 | 0 | 2 | 48 |
| Orgânico (GO) | 4 | 16 | 7 | 3 | 0 | 2 | 0 | 32 |
| Total Geral | 36 | 41 | 32 | 7 | 7 | 3 | 2 | 128 |

Na Figura 1 estão apresentadas as frequências relativas da soma de isolados resistentes, multirresistentes (MDR) e totalmente suscetíveis (Tsus) frente aos antimicrobianos testados neste estudo. As maiores frequências observadas de cepas resistentes foram frente aos antimicrobianos: tetraciclina (TET), trimetoprima (TRI) e ampicilina (AMP) com 32,4%, 28,2% e 25,0% de isolados resistentes, respectivamente. A totalidade das cepas foi suscetível à colistina, meropenem e tigeciclina. Oitenta e oito cepas (40,7%) foram totalmente suscetíveis frente à bateria de antimicrobianos testados.

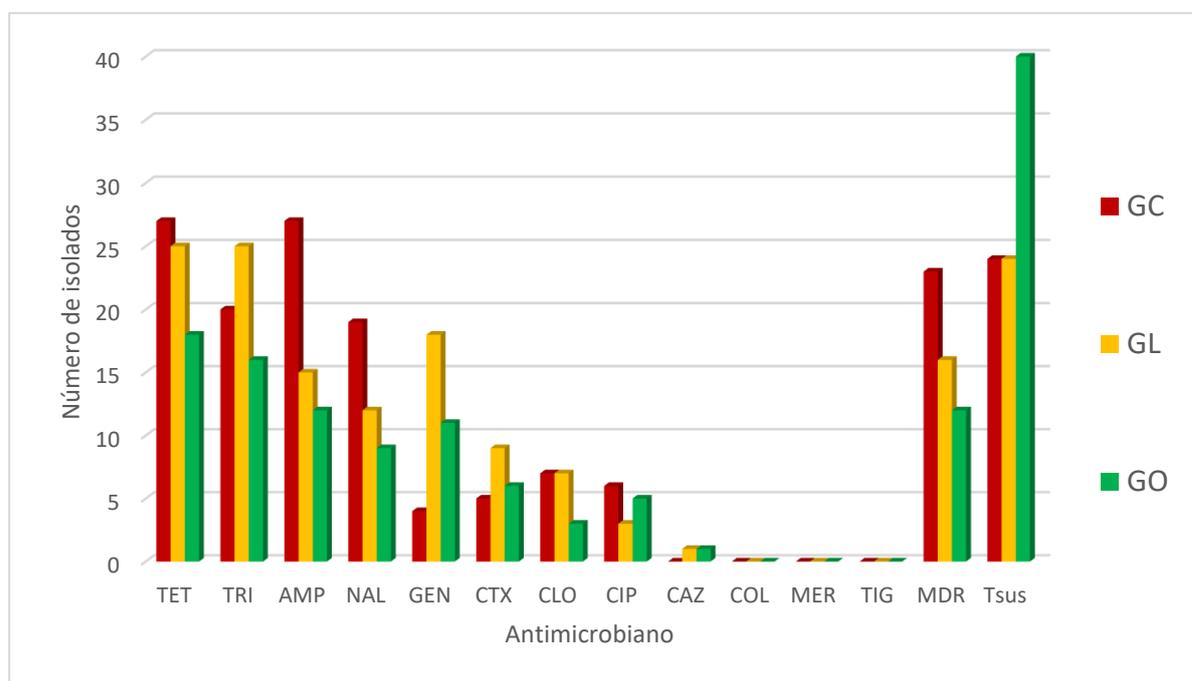
Figura 1 – Apresentação da frequência relativa da soma das cepas resistentes a cada antimicrobiano, das cepas multirresistentes (MDR) e das cepas totalmente suscetíveis (Tsus).



TET: tetraciclina, TRI: trimetoprim, AMP: ampicilina, NAL: ácido nalidíxico, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, CAZ: cefotazidima, TIG: tigeciclina, MER: meropenem, COL: colistina, MDR: multirresistente, Tsus: totalmente suscetível.

Na Figura 2 está demonstrada a distribuição (frequência absoluta) de cepas resistentes por antimicrobiano e grupo de produção além das cepas multirresistentes e totalmente suscetíveis. O grupo orgânico apresentou, praticamente, o dobro de isolados totalmente suscetíveis (n=40) se comparado aos grupos GC e GL ambos com 24 cepas Tsus. Quanto à resistência a cefalosporina de 3ª e 4ª geração (CTX e CAZ) a distribuição de cepas resistentes foi a seguinte: cinco (6,9%) no grupo GC, dez (13,9%) no grupo GL e sete (9,7%) no grupo GO.

Figura 2 – Distribuição das cepas resistentes de *E. coli*, por grupo de produção e antimicrobiano. São apresentadas também as distribuições das cepas multirresistentes e totalmente suscetíveis de acordo com o grupo de produção.



TET: tetraciclina, TRI: trimetoprim, AMP: ampicilina, NAL: ácido nalidíxico, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, COL: colistina, MER: meropenem, TIG: tigeciclina, MDR: multirresistente, Tsus: totalmente suscetível. GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Assumindo-se um nível de significância de 95%, não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias dos três grupos ($p > 0,05$) a partir do teste de análise de variância (ANOVA) Tabela 10. Nas comparações entre dois grupos, também não foi observada diferença: convencional x livre ($p = 0,96$), convencional x orgânica ($p = 0,06$) e livre x orgânica ($p = 0,07$).

Tabela 10 – Médias de antimicrobianos aos quais as cepas de cada grupo de produção (GC, GL e GO) demonstraram resistência. Os dados estão apresentados por média, mínimo e máximo.

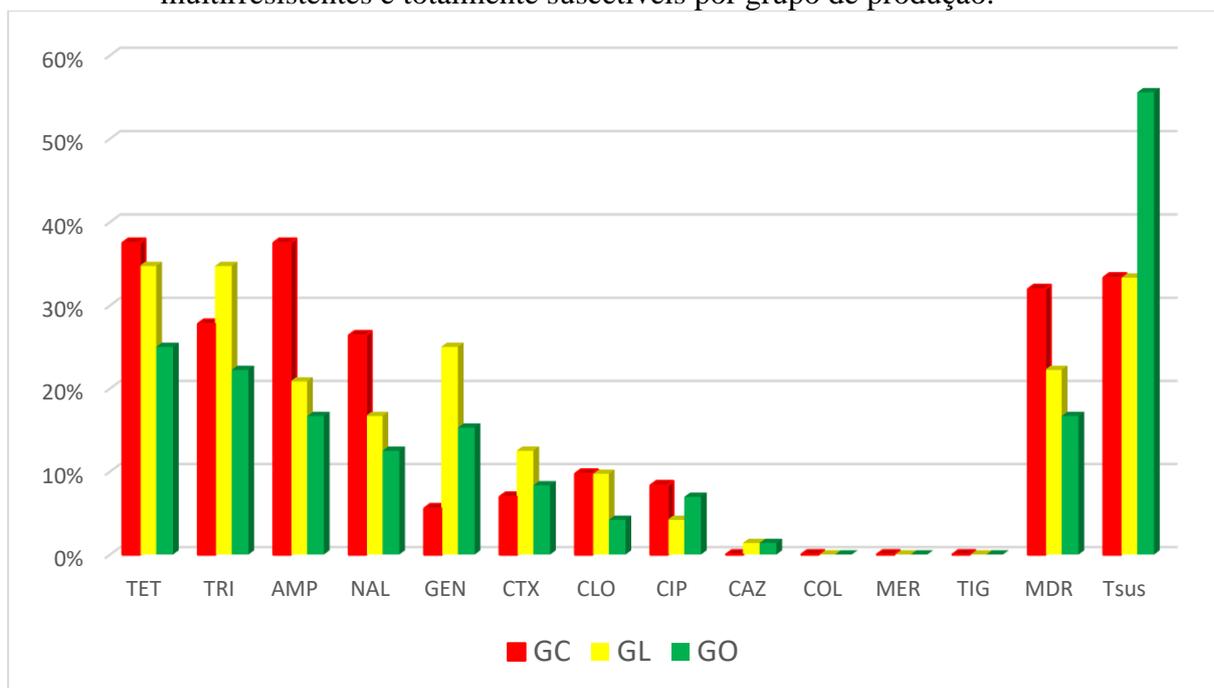
| | GC (n=72) | GL (n=72) | GO (n=72) | p-valor(a) |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas resistentes | 1,60 (0-6) | 1,58 (0-7) | 1,11 (0-6) | > 0,65 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico

Na Figura 3 estão apresentadas as frequências relativas de resistência bacteriana por grupo de produção. Pode ser observada a distribuição de resistência entre os grupos de produção frente a cada antimicrobiano testado. O percentual de resistência para tetraciclina, por exemplo, foi de 37%, 35% e 25% para os grupos GC, GL e GO, respectivamente. No caso de cepas multirresistentes, o tipo de produção convencional GC apresentou 32% (n=23) das cepas com

características de multirresistência enquanto os grupos GL e GO apresentaram 22% (n=16) e 17% (n=12), respectivamente. Quanto às cepas totalmente suscetíveis, foi observada uma frequência de 56% (0,556) de cepas Tsus no grupo orgânico enquanto tal frequência foi de 33% nos grupos GC e GL.

Figura 3 – Frequência relativa de cepas resistentes aos antimicrobianos, bem como, de cepas multirresistentes e totalmente suscetíveis por grupo de produção.



TET: tetraciclina, TRI: trimetoprim, AMP: ampicilina, NAL: ácido nalidíxico, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, COL: colistina, MER: meropenem, TIG: tigeciclina, MDR: multirresistentes (cepas resistentes à três ou mais categorias de antimicrobianos). Tsus: cepas totalmente suscetíveis à bateria de antimicrobianos testados no estudo. GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Na Tabela 11 são apresentadas as frequências relativas (FR) por suscetibilidade aos antimicrobianos. Nesta abordagem é possível verificar quanto cada categoria de produção contribui nos resultados de isolados suscetíveis ou resistentes para cada antimicrobiano testado.

Tabela 11 – Frequência relativa por suscetibilidade. Os números representam quanto cada grupo de produção contribui para o total de cepas suscetíveis ou resistentes para cada antimicrobiano.

| Antimicrobiano | GC | GL | GO | GC | GL | GO |
|------------------|------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | Suscetível | | | Resistente | | |
| Tetraciclina | 0,308 | 0,322 | 0,370 | 0,386 | 0,357 | 0,257 |
| Trimetoprim | 0,335 | 0,303 | 0,361 | 0,328 | 0,410 | 0,262 |
| Ampicilina | 0,278 | 0,352 | 0,370 | 0,500 | 0,278 | 0,222 |
| Ácido nalidíxico | 0,301 | 0,341 | 0,358 | 0,475 | 0,300 | 0,225 |
| Gentamicina | 0,372 | 0,295 | 0,333 | 0,121 | 0,545 | 0,333 |
| Cefotaxima | 0,342 | 0,321 | 0,337 | 0,250 | 0,450 | 0,300 |
| Cloranfenicol | 0,327 | 0,327 | 0,347 | 0,412 | 0,412 | 0,176 |
| Ceftazidima | 0,336 | 0,332 | 0,332 | 0,000 | 0,500 | 0,500 |
| Ciprofloxacina | 0,327 | 0,342 | 0,332 | 0,429 | 0,214 | 0,357 |
| Colisitna | 0,333 | 0,333 | 0,333 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Meropenem | 0,333 | 0,333 | 0,333 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Tigeciclina | 0,333 | 0,333 | 0,333 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Na Tabela 12 estão sumarizados os resultados gerados pelo modelo de regressão de *Poisson*, intervalo de confiança (IC) 95%. Pode-se observar que os grupos de produção apresentaram diferença estatística significativa quanto às prevalências de resistência aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, ácido nalidíxico e gentamicina além da prevalência dos isolados totalmente suscetíveis e MDR.

Para ampicilina, a prevalência de resistência no grupo livre de antimicrobianos foi de 0,56 vezes a prevalência do grupo convencional, enquanto essa prevalência foi de 0,44 vezes no grupo orgânico comparado com o convencional. Para gentamicina, os grupos GL e GO apresentaram prevalência de resistência de 4,5 e 2,7 vezes a prevalência de resistência do grupo convencional. A razão de prevalência de T_{sus} foi de 1 vez no GL e de 1,67 vezes no GO, comparadas as prevalências desta variável com o grupo base (GC).

Tabela 12 – Razões de prevalência obtidas a partir do modelo de regressão de Poisson no qual a frequência de cepas resistentes dos grupos GL e GO foi comparada à frequência de cepas resistentes de GC para cada antimicrobiano testado.

| Antimicrobiano | GL - RP | IC GL | | GO - RP | IC GO | |
|-----------------------|----------------|--------------|-------|----------------|--------------|------|
| Tetraciclina | 0,93 | 0,59 | 1,43 | 0,67 | 0,40 | 1,09 |
| Trimetoprim | 1,25 | 0,76 | 2,03 | 0,80 | 0,45 | 1,41 |
| Ampicilina | 0,56* | 0,32 | 0,95 | 0,44* | 0,24 | 0,80 |
| Ácido nalidíxico | 0,63 | 0,33 | 1,20 | 0,47* | 0,22 | 0,97 |
| Gentamicina | 4,50* | 1,60 | 12,64 | 2,75 | 0,91 | 8,23 |
| Cefotaxima | 1,80 | 0,63 | 5,10 | 1,20 | 0,38 | 3,75 |
| Cloranfenicol | 1 | 0,36 | 2,70 | 0,43 | 0,11 | 1,59 |
| Ciprofloxacina | 0,50 | 0,13 | 1,92 | 0,83 | 0,26 | 2,60 |
| Ceftazidima | 0 | (-) | (-) | 0 | (-) | (-) |
| Colistina | 0 | (-) | (-) | 0 | (-) | (-) |
| Meropenem | 0 | (-) | (-) | 0 | (-) | (-) |
| Tigeciclina | 0 | (-) | (-) | 0 | (-) | (-) |
| MDR | 0,70 | 0,40 | 1,20 | 0,52* | 0,28 | 0,96 |
| Tsus | 1 | 0,63 | 1,58 | 1,67* | 1,13 | 2,45 |

RP: razão de prevalência, IC: intervalo de confiança, GL: grupo de produção livre de antibióticos, GO: grupo de produção orgânico, (-) modelo não gerado dada a distribuição dos dados para este antimicrobiano. (*) diferença estatística para um nível de significância de 0,05.

5.3 Pesquisa de *E. coli* produtora de ESBL

A pesquisa de *E. coli* produtora de ESBL foi realizada a partir do isolamento de bactérias em meio seletivo diferencial suplementado com cefotaxima (ágar MacConkey CTX). A partir desta abordagem, das 72 carcaças de frango analisadas, 54 apresentaram crescimento bacteriano, distribuídas entre os grupos da seguinte forma: 18 carcaças do grupo convencional, 16 carcaças do grupo livre de antimicrobianos e 20 carcaças do grupo orgânico. Dessas, 164 colônias (127 fermentadoras de lactose e 37 não fermentadoras de lactose) foram isoladas e submetidas ao teste de triagem para produção de ESBL/AmpC e carbapenemases.

Em uma amostra (carcaça) foram observadas bactérias não fermentadoras de lactose com suscetibilidade reduzida ao meropenem. Após o sequenciamento do genoma total, um desses isolados foi identificado como *Pseudomonas otitidis* com a presença do gene *bla_{POM-1}*. Os dados completos da cepa constam do artigo intitulado *In-Depth Genomic Characterization of a Meropenem-nonsusceptible Pseudomonas otitidis Strain Contaminating Chicken Carcass*,

publicado em julho de 2020 (Apêndice E). Os demais isolados não fermentadores de lactose (dados não apresentados) serão analisados em outra oportunidade.

Considerando-se apenas as colônias morfológicamente compatíveis com *E. coli* (fermentadoras de lactose em ágar MacConkey), obtivemos 127 isolados os quais foram submetidos a testes bioquímicos para identificação da espécie. Por fim, foram identificadas 76 cepas fenotipicamente compatíveis com a espécie, provenientes de 29 carcaças distintas (Tabela 13).

Das 76 cepas de *E. coli*, todas foram confirmadas no teste de triagem considerando resistência à, pelo menos, uma das cefalosporinas testadas (cefotaxima e/ou ceftazidima) seguindo para a realização do teste confirmatório. A presença de *E. coli* produtora de ESBL foi confirmada pelo teste de sinergia de disco duplo frente ao ácido clavulânico (inibidor de beta-lactamase) (Figura 4A). Das 76 cepas testadas, apenas três (3,9%) não foram confirmadas neste teste. Sendo assim, 28 carcaças foram positivas para *E. coli* produtoras de ESBL, o equivalente a 39% do total de carcaças analisadas (9/24 convencional, 9/24 livre de antimicrobianos e 10/24 orgânico).

Tabela 13 – Distribuição de carcaças presuntivas positivas e confirmadas para ESBL conforme sistema de produção.

| | Convencional | | Livre de ATB | | Orgânico | | Total | |
|----------|---------------------|-----|---------------------|-----|-----------------|-----|--------------|-----|
| | PRE | POS | PRE | POS | PRE | POS | PRE | POS |
| Carcaças | 9 | 9 | 9 | 9 | 11 | 10 | 29 | 28 |
| Isolados | 23 | 23 | 23 | 23 | 30 | 27 | 76 | 73 |

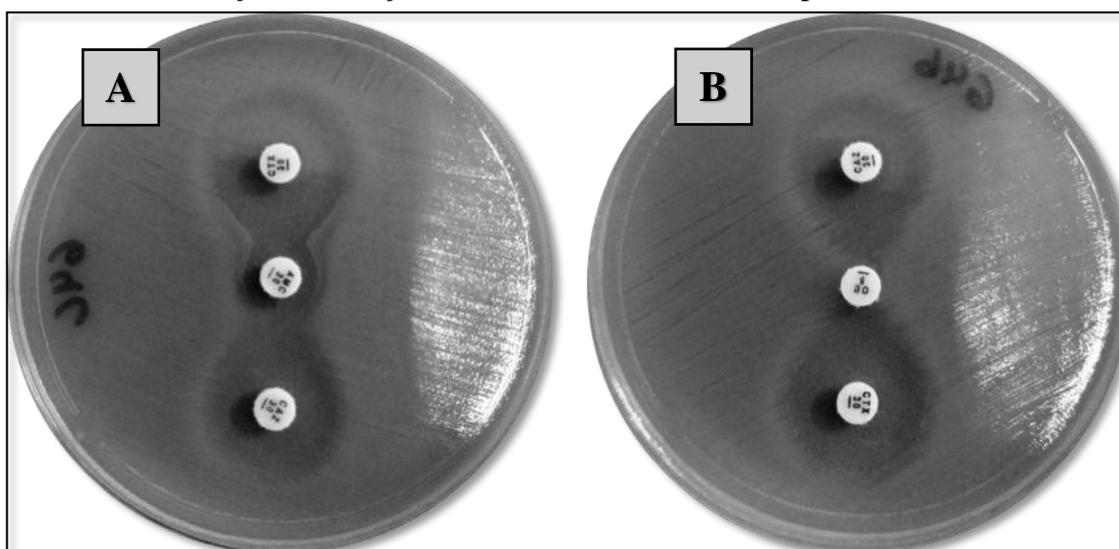
PRE: presuntivo positivo; POS: positivo confirmado

O perfil de produção de AmpC foi confirmado por meio do teste de sinergia com o antimicrobiano cloxacilina (Figura 4B). Todas as 76 cepas de *E. coli* foram testadas também para este parâmetro, independente do resultado do teste de triagem com cefoxitina (FOX). Das 25 cepas resistentes no teste de triagem à cefoxitina, 13 apresentaram sinergia positiva para cloxacilina. Além disso, quatro isolados que apresentaram medidas de halo limítrofe para cefoxitina, consideradas suscetíveis no teste de triagem (halo de inibição de 19-20 mm), também apresentaram sinergia positiva com a cloxacilina, indicando a presença de AmpC.

Sendo assim, 76,7% (56/73) das *E. coli* foram confirmadas com fenótipo de ESBL e 23,2% (17/73) dos isolados (5GC, 3GL e 9GO), provenientes de oito carcaças distintas (3GC, 1GL e 4GO), apresentaram o perfil fenotípico ESBL/AmpC. Quanto à presença de cepas

produtoras de carbapenemases, nenhum isolado apresentou perfil fenotípico de resistência a meropenem, sendo considerados negativos para a produção desta enzima.

Figura 4 – Teste de sinergia de disco duplo positivo. Placas contendo ágar Müller Hinton e inóculos bacterianos após 18-20h de incubação à 36 ± 1 °C. (A) é apresentado o teste com disco de ácido clavulânico ao centro. (B) é apresentado o teste com disco de cloxacilina ao centro. Ambos apresentam cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ) nas extremidades. A positividade do teste pode ser verificada pelo aumento dos halos de inibição em direção aos discos centrais nas duas placas.

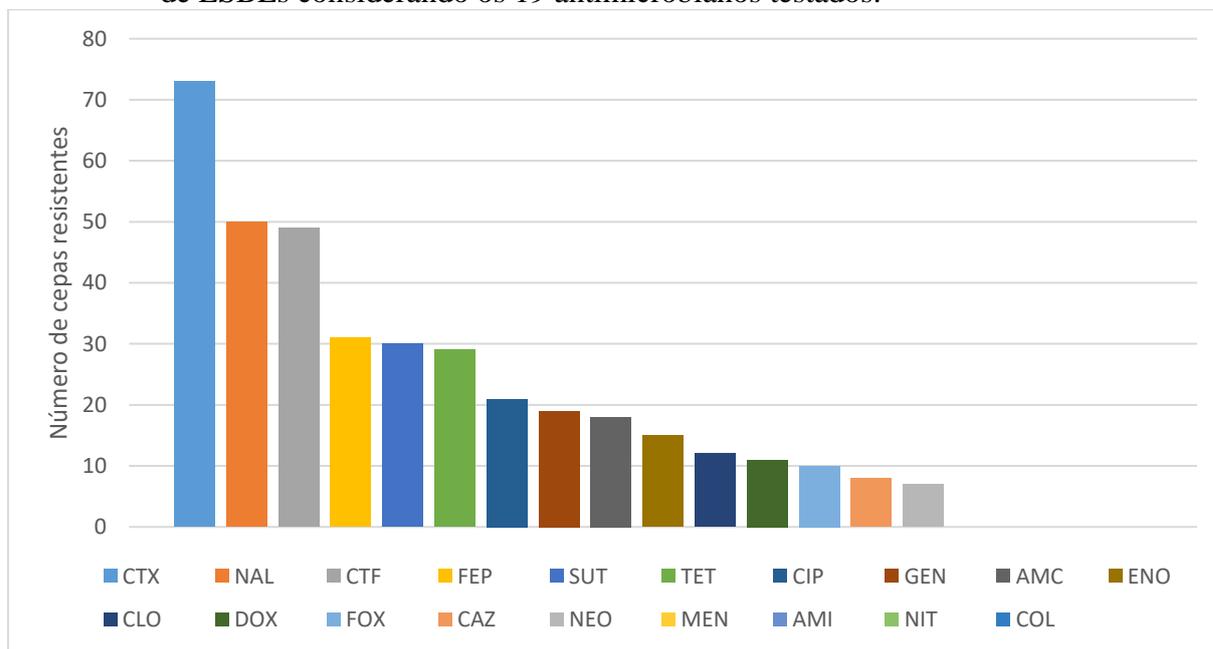


Fonte: o próprio autor

Para a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos foram avaliados 19 antimicrobianos pertencentes a doze categorias antibacterianas distintas. A frequência absoluta de resistência está apresentada na Figura 5. Além da cefotaxima para a qual a frequência foi de 100% de isolados resistentes (73/73) (conforme esperado, uma vez que este foi o antimicrobiano utilizado para a triagem das ESBL), os antimicrobianos para os quais as cepas ESBL apresentaram maior frequência de resistência foram: ácido nalidíxico (68,5%, 50/73), ceftiofur (67,1%, n=49/73), cefepime (42,5%, n=31/73), sulfametoxazol + trimetoprim (41,1%, n=30/73) e tetraciclina (39,7%, 29/73). Todos os isolados foram suscetíveis à meropenem, ampicacina, nitrofurantoína e colistina.

A maior frequência de resistência verificada foi a 11 dos 19 antimicrobianos testados, sendo uma cepa com o seguinte perfil: CTF-CTX-FEP-CLO-DOX-TET-NEO-SUT-NAL-CIP-ENO. Foram verificados 52 perfis de resistência distintos. Os perfis mais frequentes foram CTF-CTX com cinco isolados; CTF-CTX-FEP-GEN-SUT-NAL, CTF-CTX-NAL-CIP-ENO e CTX-AMC-TET-SUT-NAL-CIP-ENO com 3 isolados em cada um deles.

Figura 5 – Distribuição (números absolutos) da frequência de resistência em cepas produtoras de ESBLs considerando os 19 antimicrobianos testados.



CTX: cefotaxima, NAL: ácido nalidíxico, CTF: ceftiofur, FEP: cefepime, SUT: sulfa+trimetoprim, GEN: gentamicina, AMC: amoxicilina+clavulanato, ENO: enrofloxacin, CLO: cloranfenicol, DOX: doxiciclina, FOX: cefoxitin, CAZ: ceftazidima, NEO: neomicina, MEN: meropenem, AMI: amicacina, NIT: nitrofurantoína, COL: colistina.

Dos 73 isolados analisados, 56 (76,7%) apresentaram perfil de multirresistência, considerando resistência a 3 ou mais antimicrobianos de categorias distintas. A maior frequência de resistência verificada foi a sete categorias de antimicrobianos, com cinco isolados identificados (Tabela 14). Dessas cinco cepas, três foram provenientes de uma carcaça do sistema de produção convencional sendo resistentes as seguintes categorias de antimicrobianos: cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, cefamicina, penicilina+inibidores de β -lactamases, tetraciclina, aminoglicosídeos, inibidores da via do folato e quinolonas. As outras duas cepas foram provenientes de uma mesma carcaça do sistema livre de antimicrobianos que foram resistentes às categorias cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, fenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, inibidores da via do folato, quinolonas e fluoroquinolonas. Não houve diferença significativa ($p = 0,715$) na frequência de isolados multirresistentes comparando-se os três sistemas de produção.

Tabela 14 – Distribuição de resistência a antimicrobianos em cepas produtoras de ESBL conforme o número de categorias antibacterianas.

| Grupo | Número de categorias resistentes (%) | | | | | | | Total Geral (n) |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Convencional | 0 | 14,4 | 34,8 | 21,7 | 8,7 | 4,3 | 13,0 | 23 |
| Livre de ATB | 15,0 | 10,0 | 15,0 | 10,0 | 15,0 | 25,0 | 10,0 | 20 |
| Orgânico | 13,3 | 13,3 | 36,7 | 13,3 | 20,0 | 3,3 | 0 | 30 |
| Total Geral | 7 | 10 | 22 | 11 | 11 | 7 | 5 | 73 |

5.3.1 Avaliação do perfil genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* produtores de ESBL

Quanto à caracterização genotípica das cepas ESBL, foram selecionados 24 isolados, oito de cada grupo de produção, para o sequenciamento do genoma total. Apenas uma amostra não retornou com qualidade suficiente para a montagem e anotação do genoma, sendo assim, algumas análises foram realizadas apenas com 23 cepas.

Das 23 cepas submetidas à análise de MLST foram identificados 18 STs distintos. Quatro STs (ST117, ST345, ST648 e ST770) estiveram presentes em mais de uma cepa. Uma cepa não teve seu ST identificado.

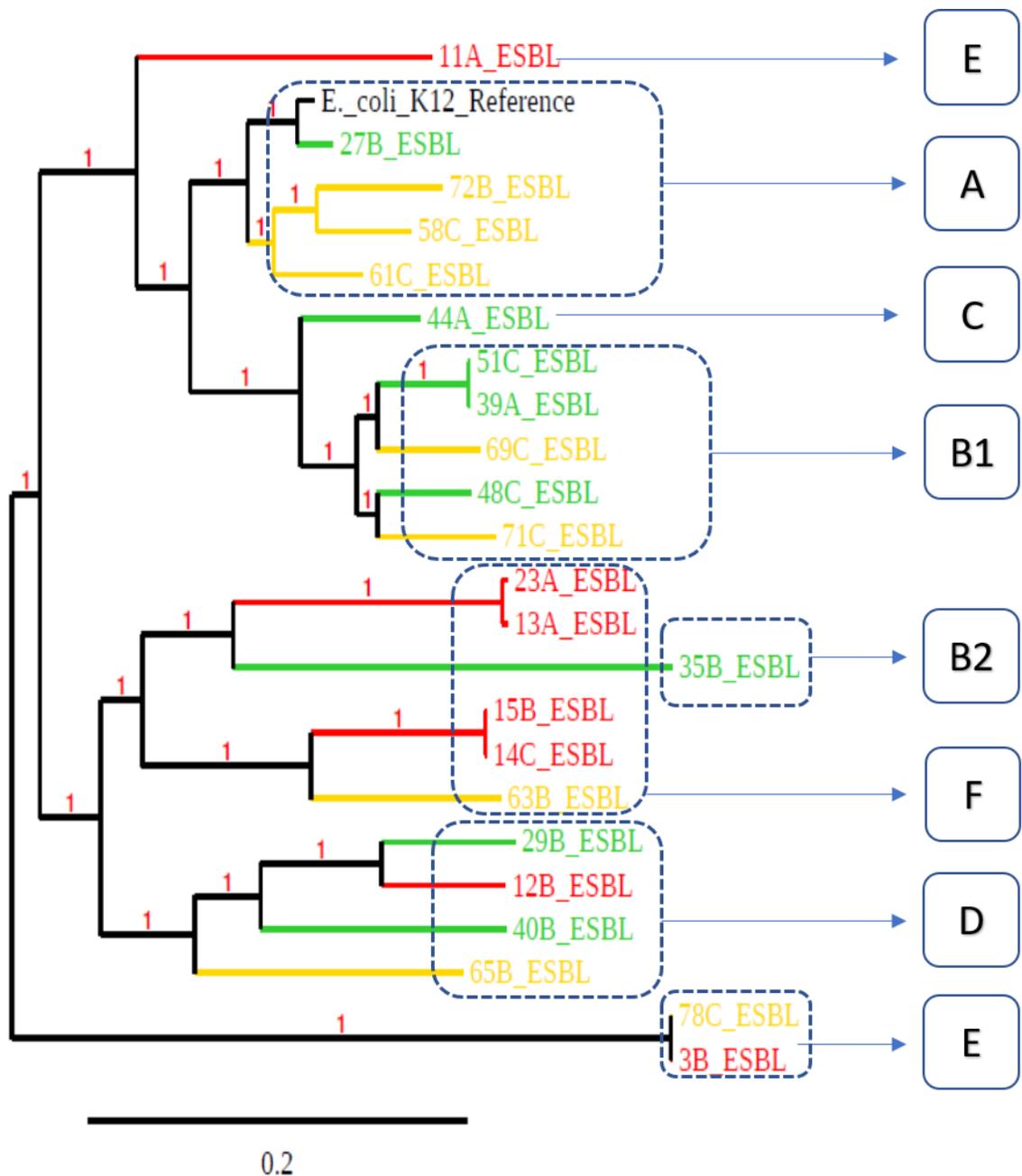
A partir da classificação filogenética de Clermont foram identificados sete grupos distintos (Tabela 15). Os filogrupos mais frequentes foram B1 e F, presentes em 22% das cepas cada, seguidos dos grupos A e D. Os grupos B2 e C foram identificados apenas em duas cepas do grupo de produção orgânico. Esses filogrupos foram evidenciados quando da visualização da árvore filogenética (Figura 6).

Tabela 15 – Distribuição das cepas de *E. coli* produtoras de ESBL conforme o grupo filogenético.

| Grupo Filogenético | GC (n=7) | GL(n=8) | GO (n=8) | % |
|--------------------|----------|---------|----------|-----|
| A | - | 3 | 1 | 17 |
| B1 | - | 2 | 3 | 22 |
| B2 | - | - | 1 | 4,3 |
| C | - | - | 1 | 4,3 |
| D | 1 | 1 | 2 | 17 |
| E | 2 | 1 | - | 13 |
| F | 4 | 1 | - | 22 |

GC: grupo convencional, GL: grupo de produção livre de antimicrobianos, GO: grupo de produção orgânico; (-) Não identificadas cepas no grupo filogenético.

Figura 6 – Análise filogenética gerada automaticamente pela plataforma <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/> utilizando a cepa referência *E. coli* K-12 (GenBank PRJNA225). As letras a direita indicam classificação filogenética de acordo com Clermont.

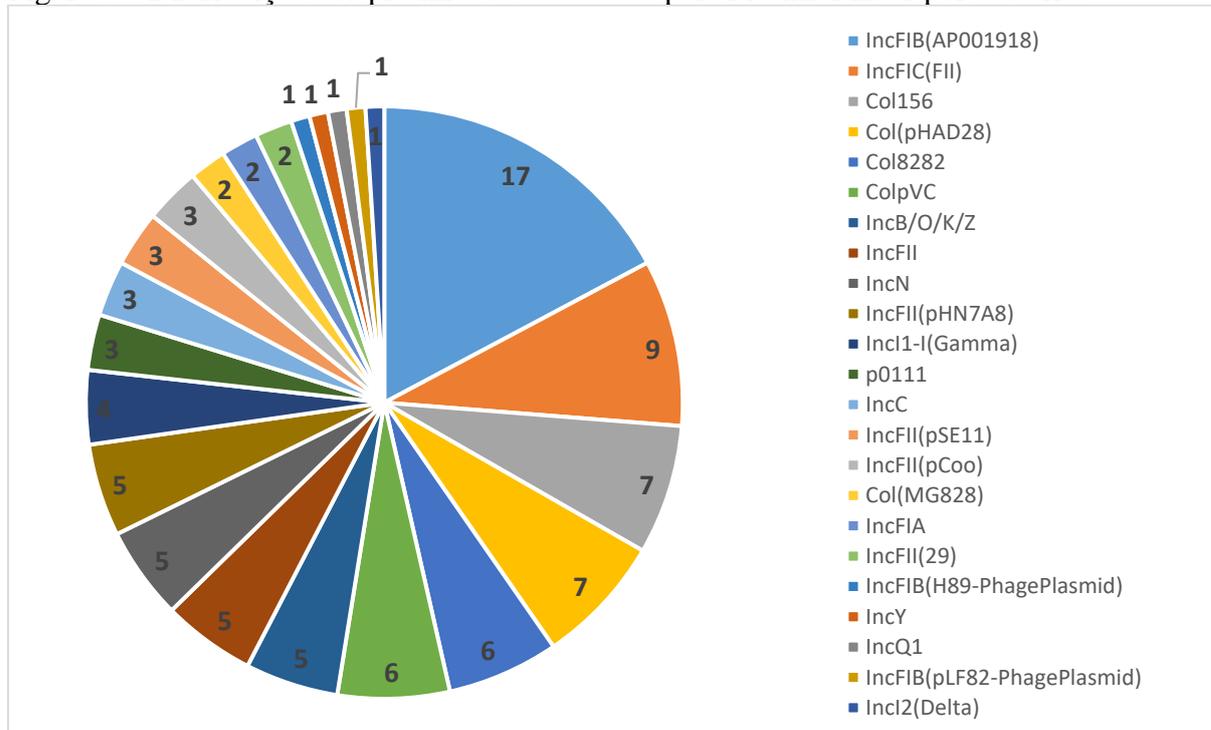


Caixas com linhas tracejadas indicam clusters conforme o grupo filogenético; caixas com linha sólida indicam a classificação filogenética; cores diferentes representam os três sistemas de produção – Vermelho: GC, Amarelo GL, Verde: GO

Quinze sorotipos estiveram presentes nas 23 cepas analisadas. Dois sorotipos (H4 e H45) estiveram presentes em três cepas cada. Os sorotipos H16, H25, H32 e H9 foram identificados em duas cepas cada, enquanto oito sorotipos estiveram presentes em apenas uma amostra cada.

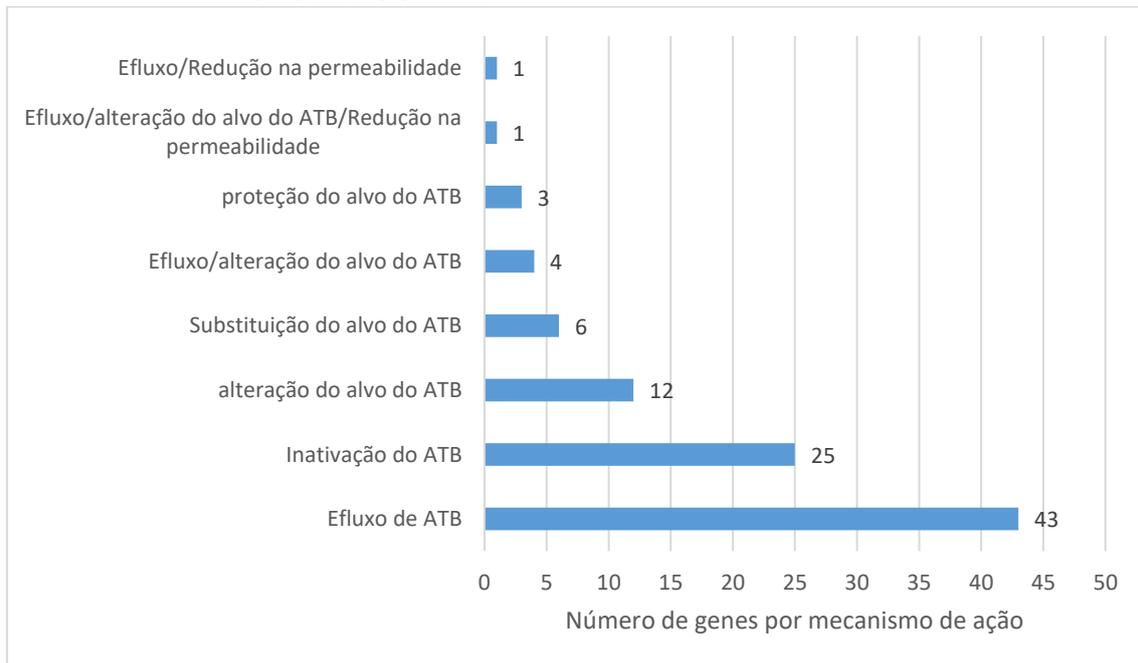
As 24 cepas foram submetidas à busca de plasmídeos. Foram identificados 23 plasmídeos diferentes (Figura 7). O plasmídeo IncFIB esteve presente em 17 das 24 cepas (70,8%). IncFIC(FII), Col156 e Col(pHAD28) foram identificados em nove, sete e sete das cepas pesquisadas, respectivamente. O maior número de plasmídeos detectados foi de oito em uma cepa (Col156 – Col8282 – IncB/O/K/Z – p011 – Col(pHAD28) – IncN – IncFII(pHN748) – ColpVC).

Figura 7 – Distribuição dos plasmídeos detectados pelo PlasmidFinder por bactéria.



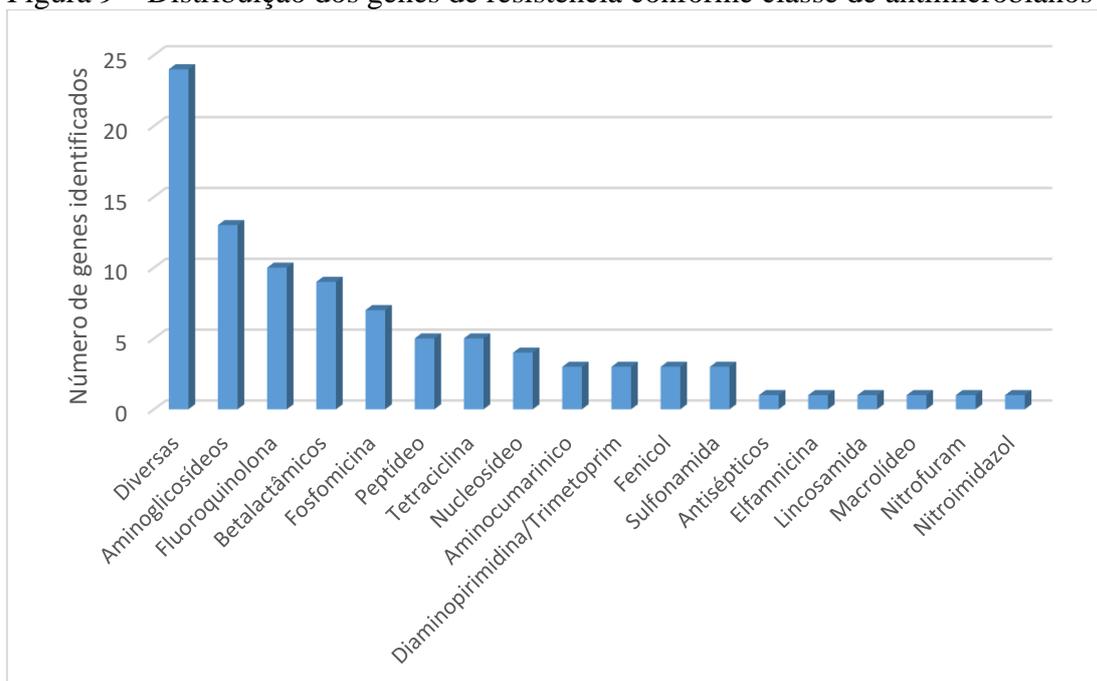
A pesquisa de genes de resistência foi realizada a partir do banco de dados CARD. Foram identificados 95 genes de resistência nas 23 cepas incluídas na análise. Dentre os mecanismos de resistência presentes (Figura 8) os mais frequentes foram os responsáveis por efluxo dos antimicrobianos, presente em todas as cepas.

Figura 8 – Distribuição dos genes de resistência mapeados pelo CARD conforme mecanismo de resistência.



Genes que conferem resistência a mais de uma classe de antimicrobianos foram os mais frequentes, representando 25,2% dos genes de resistência identificados. Considerando a resistência a classes específicas, genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e betalactâmicos representaram 13,7%, 10,5% e 9,5% dos genes, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição dos genes de resistência conforme classe de antimicrobianos



Dentre os genes que conferem resistência aos betalactâmicos, foram identificados genes codificadores de enzimas do tipo pAmpC (*bla*_{CMY-2}) e ESBL (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-2A} e *bla*_{TEM-141-1}) conforme descrito na Figura 10.

A correspondência dos genes codificadores de AmpC (*bla*_{CMY-2}), ESBLs (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-2A} e *bla*_{TEM-141-1}) e quinolonas (*qnrB19*) com plasmídeos foi confirmada. Os genes CTX-M-55 e TEM-141-1 foram identificados no mesmo *contig* tendo este como referência um mesmo plasmídeo em todas as amostras. Na tabela 16 estão apresentados os principais resultados obtidos a partir do sequenciamento das 23 *E. coli* produtoras de ESBL.

Figura 10 – Frequência de genes codificadores de enzimas ESBL e pAmpC identificados em plasmídeos.

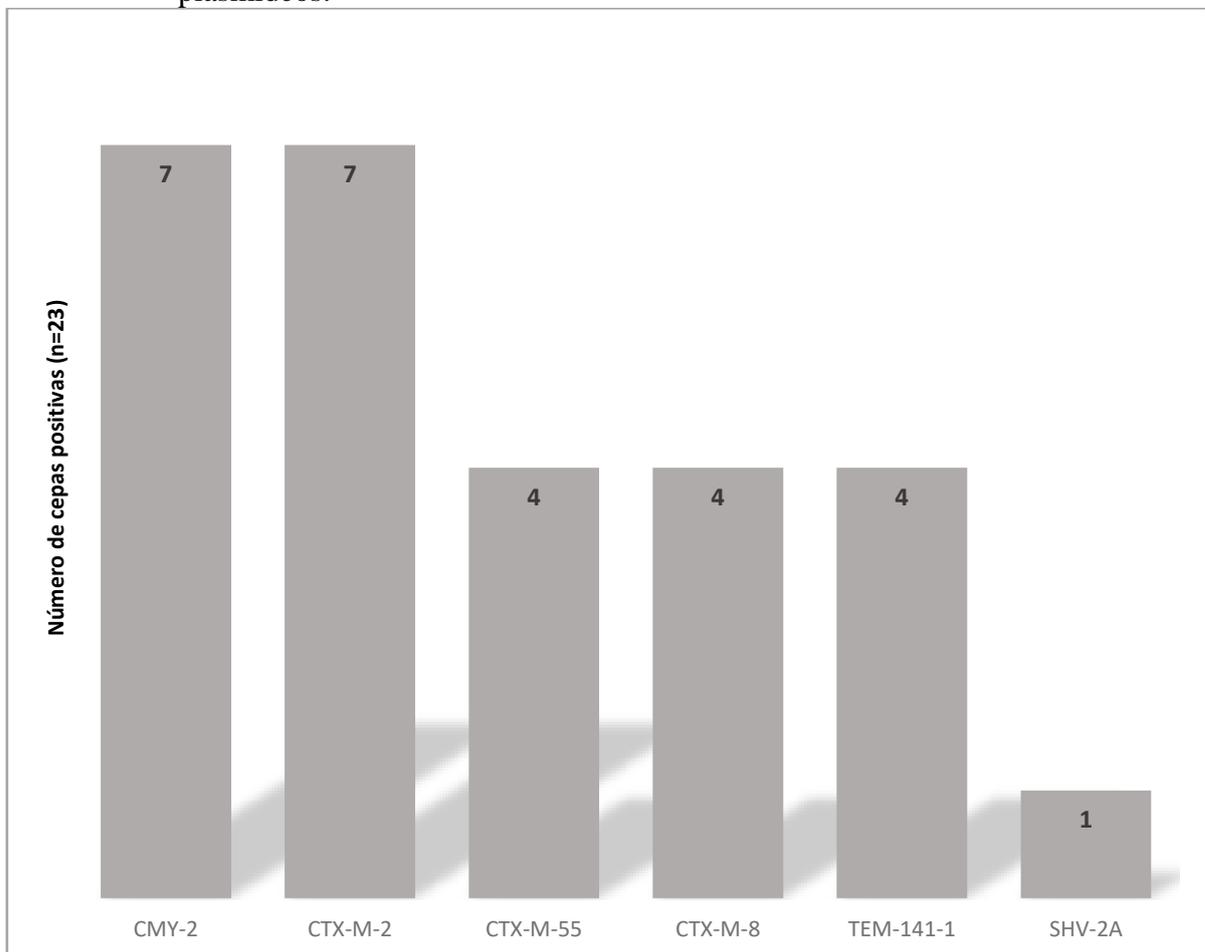


Tabela 16 – Panorama geral com os dados compilados das 23 cepas de *E. coli* produtoras de ESBL sequenciadas.

(Continua)

| ID | Grupo | ST#1 | CP ⁽²⁾ | Sorotipo | Perfil fenotípico | pAmpC e ESBL | Genes de Resistência ⁽¹⁾ |
|-----|-------|------|-------------------|----------|--|--------------|---|
| 3B | 1 | 770 | E | H45 | FOX-CTX-NAL (ESBL/AmpC) | CMY-2 | <i>acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, eptA, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, ugd, YojI</i> |
| 11A | 1 | 57 | E | H25 | FOX-CTX-AMC- DOX-TET-NEO- SUT-NAL (ESBL/AmpC) | -- | <i>acrD, APH(3')-Ia, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, dfrA14, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrR, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, sul2, tet(B), tetR, ugd, YojI</i> |
| 12B | 1 | 38 | D | H18 | CTF-CTX-FEP-DOX- TET (ESBL) | CTX-M-8 | <i>acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrR, emrY, eptA, GlpT*</i> , <i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, ugd, YojI</i> |
| 13A | 1 | 117 | F | H4 | CTF-CTX-SUT-NAL- CIP (ESBL) | CTX-M-2 | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrR, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, sul1, sul2, YojI</i> |
| 14C | 1 | 648 | F | H9 | CTF-CTX-DOX- TET-GEN-SUT-NAL (ESBL) | CTX-M-8 | <i>AAC(3)-Via, acrD, ANT(3'')-IIa, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, SAT-2, sul1, sul2, tet(B), tetR, ugd, YojI</i> |
| 15B | 1 | 648 | F | H9 | CTF-CTX-FEP-DOX- TET-GEN (ESBL) | CTX-M-2 | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, sul1, sul2, tet(B), tetR, ugd, YojI</i> |
| 23A | 1 | 117 | F | H4 | CTF-CTX-FEP-GEN- SUT-NAL (ESBL) | CTX-M-2 | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrR, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, sul1, sul2, YojI</i> |
| 27B | 3 | 34 | A | O162:H33 | CTF-CTX-FEP-CLO- DOX-TET-SUT-NAL (ESBL) | CTX-M-2 | <i>aadA, acrD, APH(6)-Id, bacA, catI, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, qnrE1, sul1, sul2, tet(A), YojI</i> |

(continuação)

| ID | Grupo | ST#1 | CP ⁽²⁾ | Sorotipo | Perfil fenotípico | AmpC e ESBL | Genes de Resistência ⁽¹⁾ |
|-----|-------|------|-------------------|----------|--|---------------------|--|
| 29B | 3 | 115 | D | H4 | FOX-CTX-AMC-NAL-CIP-ENO (ESBL/AmpC) | CMY-2 | <i>acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, nfs*</i> , <i>parC, PmrF, ugd, YojI</i> |
| 35B | 3 | 131 | B2 | O25:H4 | CTF-CTX-CAZ-FEP-DOX-TET-NAL (ESBL) | CTX-M-55, TEM-141-1 | <i>acrD, bacA, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, PtsI*</i> , <i>tet(B), tetR, ugd, UhpT*</i> , <i>YojI</i> |
| 39A | 3 | 345 | B1 | H32 | CTF-CTX-FEP-CLO-TET-SUT-NAL-CIP (ESBL) | CTX-M-8 | <i>aadA, aadA2, acrD, bacA, cmlA1, dfrA12, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, FosA6, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacH, sul3, tet(A), ugd, YojI</i> |
| 40B | 3 | 4243 | D | H45 | FOX-CTX-CAZ-GEN (ESBL/AmpC) | CMY-2 | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, cyaA*</i> , <i>EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, sul1, sul2, ugd, UhpT*</i> , <i>YojI</i> |
| 44A | 3 | 23 | C | O8:H9 | FOX-CTX-CAZ-AMC-GEN (ESBL/AmpC) | CMY-2 | <i>AAC(3)-Iid, acrD, bacA, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, GlpT*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, YojI</i> |
| 48C | 3 | 162 | B1 | O88:H10 | CTF-CTX-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CTX-M-55, TEM-141-1 | <i>acrD, bacA, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, FosA3, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, ugd, YojI</i> |
| 51C | 3 | 345 | B1 | H32 | CTF-CTX-CLO-TET-SUT-NAL (ESBL/AmpC) | CTX-M-8 | <i>aadA, aadA2, acrD, bacA, cmlA1, dfrA12, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, FosA6, GlpT*</i> , <i>gyrA*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacH, sul3, tet(A), YojI</i> |
| 58C | 2 | 4937 | A | H38 | CTF-CTX-FEP-TET-SUT (ESBL) | CTX-M-2 | <i>AAC(3)-IV, acrD, ANT(3'')-IIa, APH(4)-Ia, bacA, cyaA*</i> , <i>dfrA1, EF-Tu*</i> , <i>emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*</i> , <i>kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, SAT-2, sul1, tet(A), tet(B), tetR, ugd, YojI</i> |

(conclusão)

| ID | Grupo | ST#1 | CP ⁽²⁾ | Sorotipo | Perfil fenotípico | AmpC e ESBL | Genes de Resistência ⁽¹⁾ |
|-----|-------|-------|-------------------|----------|--|----------------------------|---|
| 61C | 2 | 8132 | A | H5 | CTF-CTX-FEP-CLO-DOX-TET-NEO-SUT-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CTX-M-2 | <i>aadA3, acrD, ANT(3'')-IIa, APH(3')-Ia, bacA, catI, dfrA1, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, GlpT*, kdpE, linG, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, QnrS1, sul1, sul2, tet(A), YojI</i> |
| 63B | 2 | 10064 | F | H42 | CTF-CTX-FEP-GEN-SUT-NAL-CIP (ESBL) | CTX-M-2 | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, cyaA*, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, GlpT*, gyrA*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, qacEdelta1, sul1, sul2, UhpT*, YojI</i> |
| 65B | 2 | NI | D | H25 | CTX-GEN-NAL (ESBL) | SHV-2A | <i>AAC(3)-Via, aadA, acrD, bacA, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, SAT-2, sul1, sul2, ugd, YojI</i> |
| 69C | 2 | 295 | B1 | H16 | CTX-AMC-TET-SUT-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CMY-2 | <i>AAC(3)-IV, acrD, ANT(3'')-IIa, APH(4)-Ia, bacA, dfrA14, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*, gyrA*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, SAT-2, sul1, tet(A), ugd, YojI</i> |
| 71C | 2 | 224 | B1 | H23 | CTF-CTX-FEP-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CTX-M-55, TEM-141-1 | <i>AAC(3)-IV, acrD, ANT(3'')-IIa, APH(4)-Ia, bacA, dfrA14, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, GlpT*, gyrA*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, qacEdelta1, QnrB19, SAT-2, sul1, tet(A), ugd, YojI</i> |
| 72B | 2 | 93 | A | H16 | FOX-CTF-CTX-CAZ-FEP-AMC-SUT-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CMY-2, CTX-M-55, TEM-141-1 | <i>acrD, APH(6)-Id, bacA, cyaA*, dfrA14, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, emrE, FosA3, GlpT*, gyrA*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, QnrB19, sul2, ugd</i> |
| 78C | 2 | 770 | E | H45 | FOX-CTX-CAZ-AMC-CLO-TET-NEO-NAL-CIP-ENO (ESBL) | CMY-2 | <i>acrD, APH(3')-Ia, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, cyaA*, EF-Tu*, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, floR, GlpT*, gyrA*, kdpE, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, parC, PmrF, sul2, tet(A), ugd, YojI</i> |

NI: Não identificado usando a referência MLST *Escherichia coli*#1; (1) genes de resistência identificados no CARD, excluída a classe dos Betalactâmicos e múltiplas classes; (*) indica gene com mutação; (2) CP: Clermont Phylotyper - <https://ezclermont.hutton.ac.uk/>

5.4 Metarresistoma e metagenômica

5.4.1 Sequenciamento de alto desempenho (processamento das sequências)

Para as análises de metarresistoma e metagenômica, quatro *pools* das amostras de DNA total de cada grupo foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq System. O número de sequências (*paired-end reads*) geradas de cada *pool*, em cada rodada de sequenciamento, está apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Total de *reads* geradas em cada rodada de sequenciamento por agrupamento das amostras conforme o grupo de produção.

| Pool | GC (reads) | GL (reads) | GO (reads) |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 3.229.468 | 5.038.652 | 9.033.480 |
| 2 | 1.612.656 | 3.175.816 | 1.424.198 |
| 3 | 2.114.276 | 2.032.212 | 3.240.102 |
| 4 | 2.199.820 | 4.317.620 | 2.973.594 |
| Total | 9.156.220 | 14.564.300 | 16.671.374 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Realizadas as análises das sequências conforme descrito no item 4.7.3, as sequências *paired-end* foram alinhadas frente ao genoma referência do hospedeiro (*Gallus gallus galGal4*). Na tabela 18 estão apresentados os dados obtidos a partir deste processo. Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,779$), considerando nível de significância de 0,05, entre a quantidade de *reads* mapeadas por grupo (GC, GL e GO) frente ao genoma do hospedeiro. Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa ($p = 0,276$) quando comparadas as médias das sequências mapeadas que não parearam com o genoma referência.

Tabela 18 – Total de *reads* alinhadas, conforme o pool sequenciado, frente ao genoma referência do hospedeiro (*Gallus gallus* - galGal4).

| Amostras | Total <i>reads</i> pareadas | <i>reads Gallus gallus</i> | <i>reads Gallus gallus</i> (%) |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| GC_1 | 1614734 | 840756 | 52,06 |
| GC_2 | 806328 | 507492 | 62,93 |
| GC_3 | 1057138 | 609398 | 57,64 |
| GC_4 | 1099910 | 368572 | 33,50 |
| GL_1 | 2519326 | 953803 | 37,85 |
| GL_2 | 1587908 | 987135 | 62,16 |
| GL_3 | 1016106 | 587693 | 57,83 |
| GL_4 | 2158810 | 4708 | 0,21 |
| GO_1 | 4516740 | 997119 | 22,07 |
| GO_2 | 712099 | 116800 | 16,40 |
| GO_3 | 1620051 | 425293 | 26,25 |
| GO_4 | 1486797 | 287012 | 19,30 |

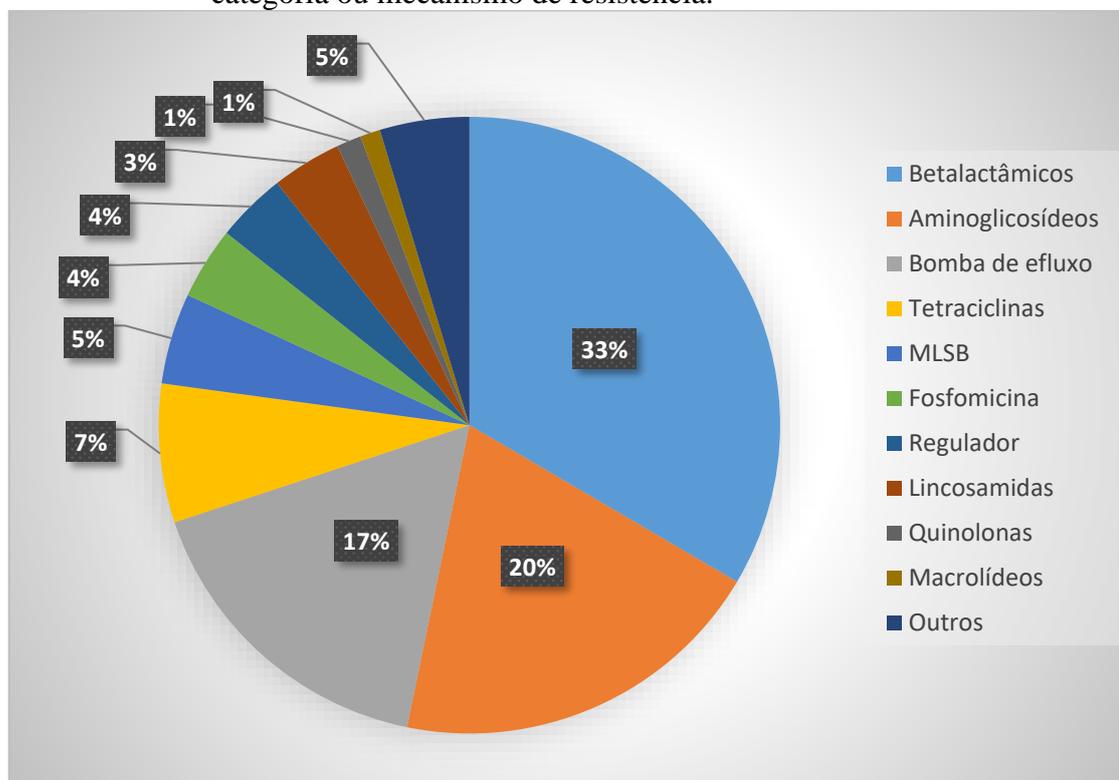
GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

5.4.2 Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

As sequências foram mapeadas frente ao banco de dados do CARD para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos. A partir desta abordagem foram detectados fragmentos de 152 genes responsáveis por codificar mecanismos de resistência bacteriana (Apêndice F). Esses genes foram classificados considerando-se as categorias de antimicrobianos ou mecanismos de resistência como, por exemplo, as bombas de efluxo ou genes reguladores, conforme a anotação do gene no banco de dados utilizado.

As três principais categorias de resistência bacteriana detectadas, somando-se a evidência dos genes nos três grupos de produção foram betalactâmicos, representando 33% do total dos genes, seguido de aminoglicosídeos e bombas de efluxo representando 20% e 17%, respectivamente, do total de genes detectados (Figura 11).

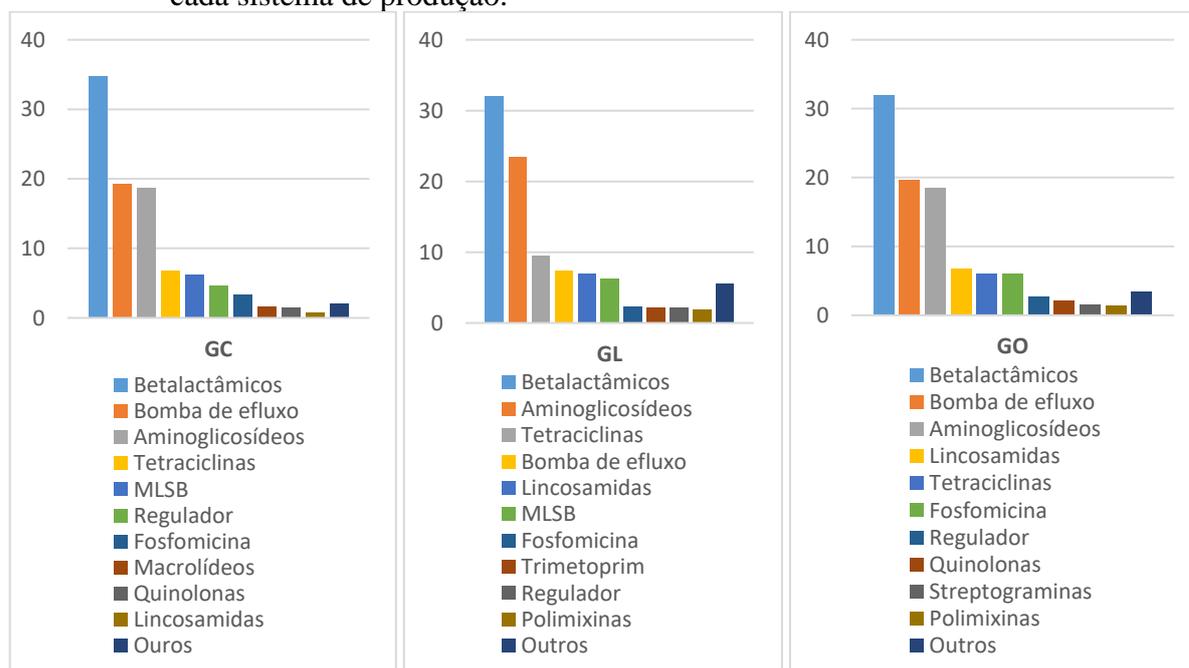
Figura 11 – Percentual da distribuição dos genes de resistência bacteriana, por categoria, detectados em todos os grupos de produção conforme a categoria ou mecanismo de resistência.



MLSB: Macrolídeos-Lincosamidas-Streptograminas B.

Analisando-se os grupos de produção separadamente, a categoria dos betalactâmicos apresentou os genes mais frequentemente identificados nos três grupos (34,8%, 32,0% e 31,8%), seguida de bomba de efluxo e aminoglicosídeos nos grupos GC (19,3% e 18,7%) e GO (19,5% e 18,5%). O grupo GL apresentou característica diferente, sendo detectados, prioritariamente, além dos betalactâmicos, genes que conferem resistência a aminoglicosídeos (23,4%) e tetraciclina (9,5%) (Figura 12). A evidência de genes que conferem resistência a quinolonas não foi verificada no grupo livre de antimicrobianos, sendo evidenciada nos outros dois grupos.

Figura 12 – Frequência relativa de resistência às dez classes bacterianas mais frequentes em cada sistema de produção.



GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico; MLSB: Macrolídeos-Lincosamidas-Streptograminas B.

Os índices de Shannon e Simpson foram calculados para a determinação da diversidade dos genes de resistência detectados em cada grupo. Cada *pool* sequenciado foi considerado como uma amostra sendo que cada grupo representa um habitat distinto (MUNK et al., 2018). Os índices de diversidade calculados indicam alta diversidade de genes de resistência nos três grupos de produção, não havendo diferença significativa quanto a diversidade calculada comparando-se os índices dos três grupos conforme apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 – Diversidade de genes de resistência conforme índices de Shannon e Simpson calculados por *pool* de sequenciamento.

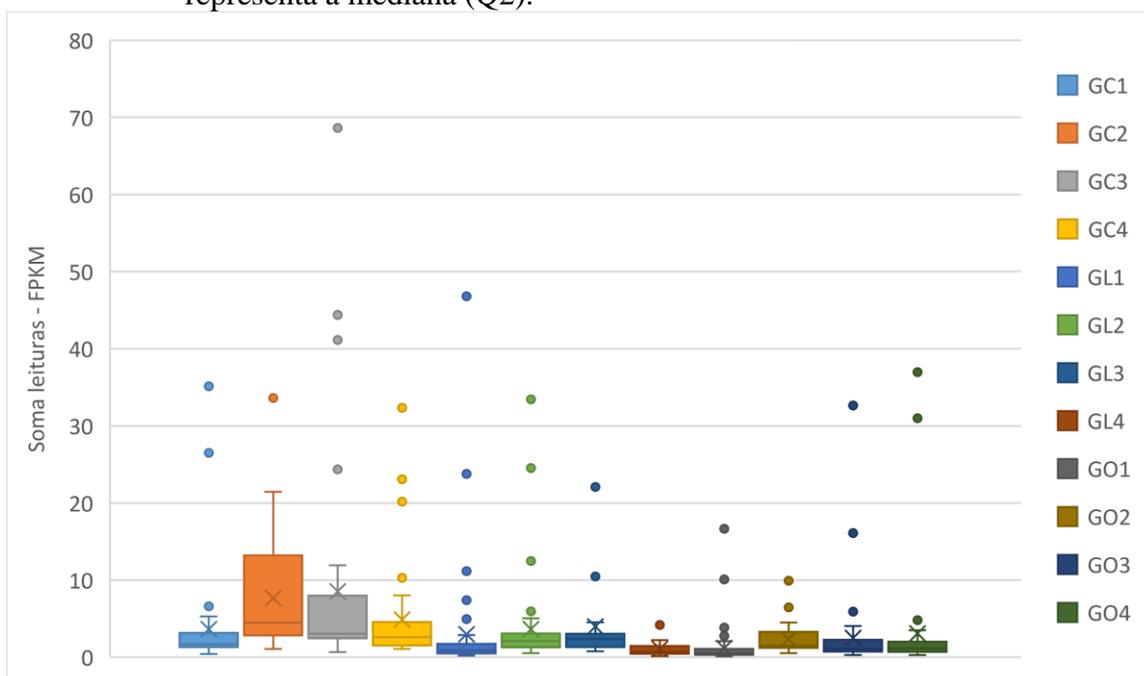
| Índice | GC | | | | GL | | | | GO | | | | <i>p</i> -valor (a) |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Shannon | 3,19 | 3,04 | 2,86 | 3,05 | 2,51 | 3,11 | 2,25 | 3,15 | 3,28 | 3,45 | 3,00 | 2,63 | 0,551 |
| Simpson* | 0,92 | 0,94 | 0,90 | 0,92 | 0,82 | 0,92 | 0,83 | 0,94 | 0,92 | 0,96 | 0,89 | 0,84 | 0,634 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico. (a) Teste Kruskal-Wallis - nível de significância de 5%. (*) Simpson (1-D).

A abundância dos genes de resistência, considerando-se a soma das leituras por *pool*, após a normalização (FPKM), está apresentada na Figura 13. Não houve diferença estatística significativa da abundância de genes de resistência comparando-se o grupo orgânico vs grupo

livre de antimicrobianos ($p = 1,00$). Foi identificada diferença estatística significativa da abundância de genes quando comparados o grupo orgânico vs convencional ($p < 0,001$) e livre de antimicrobianos vs convencional ($p = 0,005$) sendo maior para o grupo convencional nas duas comparações (Tabela 20 e Figura 14).

Figura 13 – Abundância geral (FPKM) de genes de resistência por subpopulação (*pool*). Boxplots: uma caixa representa o percentil 25 (Q1) a 75 (Q3), a linha central representa a mediana (Q2).



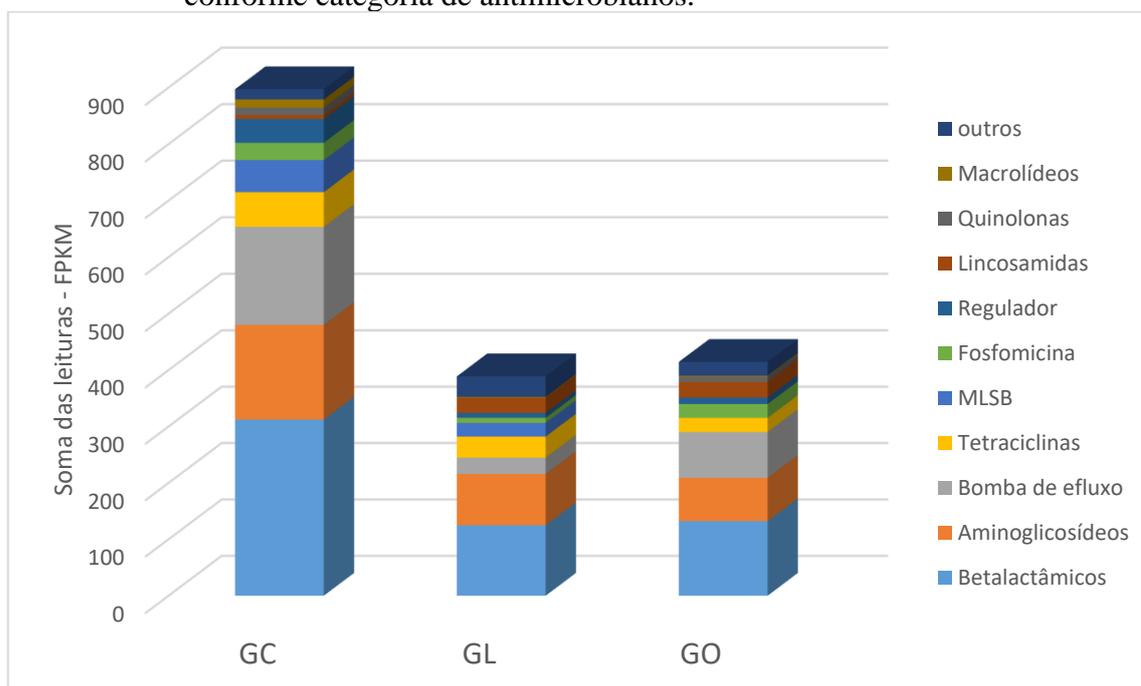
GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por kilobase por milhão.

Tabela 20 – Distribuição das leituras normalizadas dos genes de resistência. Os dados estão apresentados por mediana, mínimo e máximo.

| | GC (n=84) | GL (n=73) | GO (n=102) | p-valor(a) |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| FPKM | 3,07 (0,42 – 169,71) ^b | 2,00 (0,31 – 107,27) ^a | 1,57 (0,20 – 80,03) ^a | <0,001*a |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por kilobase por milhão. (a) Teste Kruskal-Wallis. Nas linhas, os valores com diferentes letras sobrescritas (^{a,b}) indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos avaliados com base no teste de post hoc de Dunn-Bonferroni.

Figura 14 – Abundância de genes de resistência por grupo de produção, distribuídos conforme categoria de antimicrobianos.

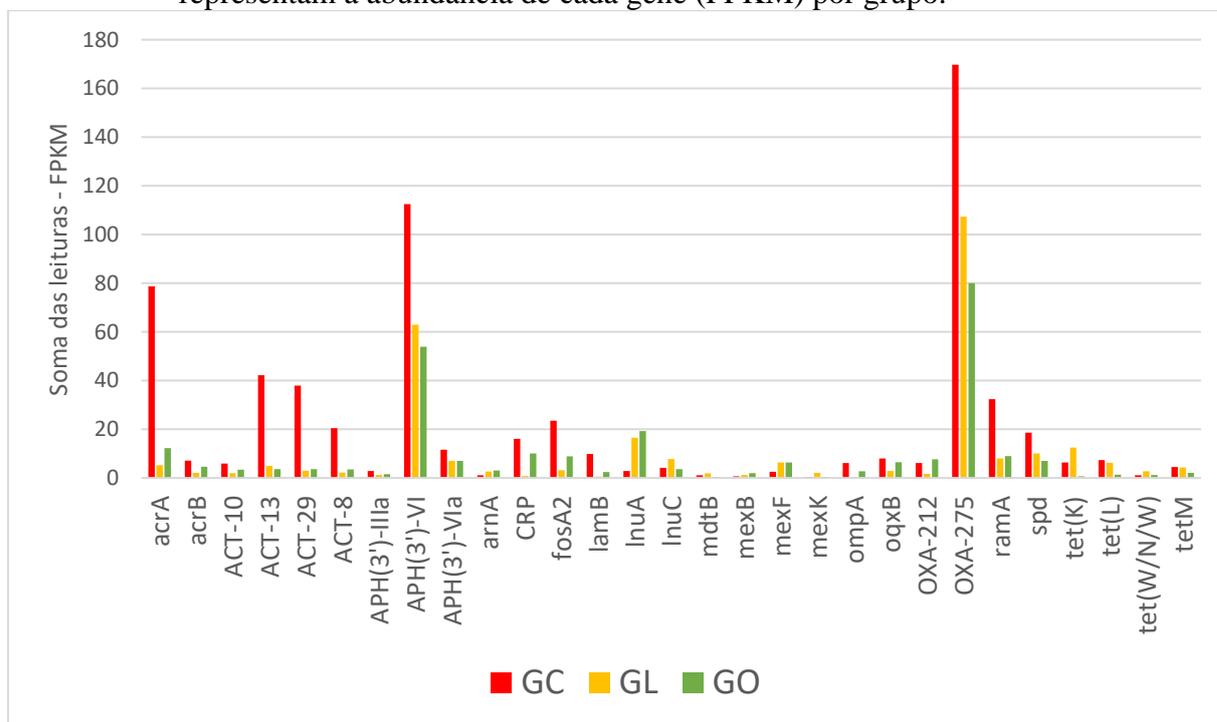


GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por milhão. MLSB: Macrolídeos-Lincosamidas-Streptograminas B.

5.4.2.1 Corerresistoma

Para a determinação do corerresistoma foram utilizadas as somas dos genes de resistência bacteriana detectados em cada grupo de produção, sendo considerado como corerresistoma, os genes que foram detectados em todos os grupos. Vinte e nove genes foram comuns aos três grupos, incluindo os genes que conferem resistência a betalactâmicos (ACT 8, 10, 13 e 29; *bla_{OXA-212}* e *bla_{OXA-275}*), aminoglicosídeos (APH(3')-IIIa, VI, e VIa) e tetraciclina (*tet K*, L, (W/N/W e M), além de genes de bombas de efluxo que podem conferir resistência a mais de uma categoria de antimicrobianos (Figura 15).

Figura 15 – Corerresistoma. São apresentados os genes de resistência a antimicrobianos detectados, concomitantemente, nos três grupos de produção. As barras representam a abundância de cada gene (FPKM) por grupo.



GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por milhão.

Além disso, alguns genes foram exclusivamente identificados em cada grupo (Tabela 21). Dos 152 genes evidenciados, foram identificados 28 genes exclusivos do grupo convencional, 15 genes exclusivos do grupo de produção livre de antimicrobianos e 31 genes exclusivos do grupo orgânicos.

Tabela 21 – Genes de resistência a antimicrobianos detectados, exclusivamente, em cada grupo de produção.

| Gene | Resistência | (Continua) | | |
|------------------------|------------------|------------|----|----|
| | | GC | GL | GO |
| mdtC | Aminocumarim | | | ■ |
| AAC(6')-Ib9 | Aminoglicosídeos | | | ■ |
| AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia | Aminoglicosídeos | | ■ | |
| AAC(6')-Ii | Aminoglicosídeos | | ■ | |
| ANT(3'')-IIa | Aminoglicosídeos | ■ | | |
| APH(3'')-Ib | Aminoglicosídeos | ■ | | |
| APH(6)-Id | Aminoglicosídeos | ■ | | |
| cpxA | Aminoglicosídeos | ■ | | |
| SAT-2 | Aminoglicosídeos | ■ | | |
| ACC-1 | Betalactâmicos | | ■ | |
| ACT-38 | Betalactâmicos | ■ | | |

(continuação)

| Gene | Resistência | GC | GL | GO |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| ampC | Betalactâmicos | | | |
| Bcl | Betalactâmicos | | | |
| CARB-5 | Betalactâmicos | | | |
| CPS-1 | Betalactâmicos | | | |
| omp1 | Betalactâmicos | | | |
| ompK36 | Betalactâmicos | | | |
| OXA-280 | Betalactâmicos | | | |
| OXA-281 | Betalactâmicos | | | |
| OXA-309 | Betalactâmicos | | | |
| acrD | Bomba de efluxo | | | |
| acrF | Bomba de efluxo | | | |
| acrS | Bomba de efluxo | | | |
| arlR | Bomba de efluxo | | | |
| axyY | Bomba de efluxo | | | |
| cmeA | Bomba de efluxo | | | |
| cmeB | Bomba de efluxo | | | |
| cmr/cmiA | Bomba de efluxo | | | |
| efrB | Bomba de efluxo | | | |
| emeA | Bomba de efluxo | | | |
| gadX | Bomba de efluxo | | | |
| H-NS | Bomba de efluxo | | | |
| lmrS | Bomba de efluxo | | | |
| marA | Bomba de efluxo | | | |
| mdtF | Bomba de efluxo | | | |
| mdtM | Bomba de efluxo | | | |
| mexQ | Bomba de efluxo | | | |
| MFS | Bomba de efluxo | | | |
| muxB | Bomba de efluxo | | | |
| smeC | Bomba de efluxo | | | |
| smeD | Bomba de efluxo | | | |
| tolC | Bomba de efluxo | | | |
| cmlA1 | Fenicol | | | |
| fosB1 | Fosfomicina | | | |
| fosD | Fosfomicina | | | |
| lnuB | Lincosamidas | | | |
| mef(En2) | Macrolídeos | | | |
| mel | Macrolídeos | | | |
| msrC | Macrolídeos | | | |
| ermA | MLSB | | | |
| ermF | MLSB | | | |
| ermG | MLSB | | | |

(conclusão)

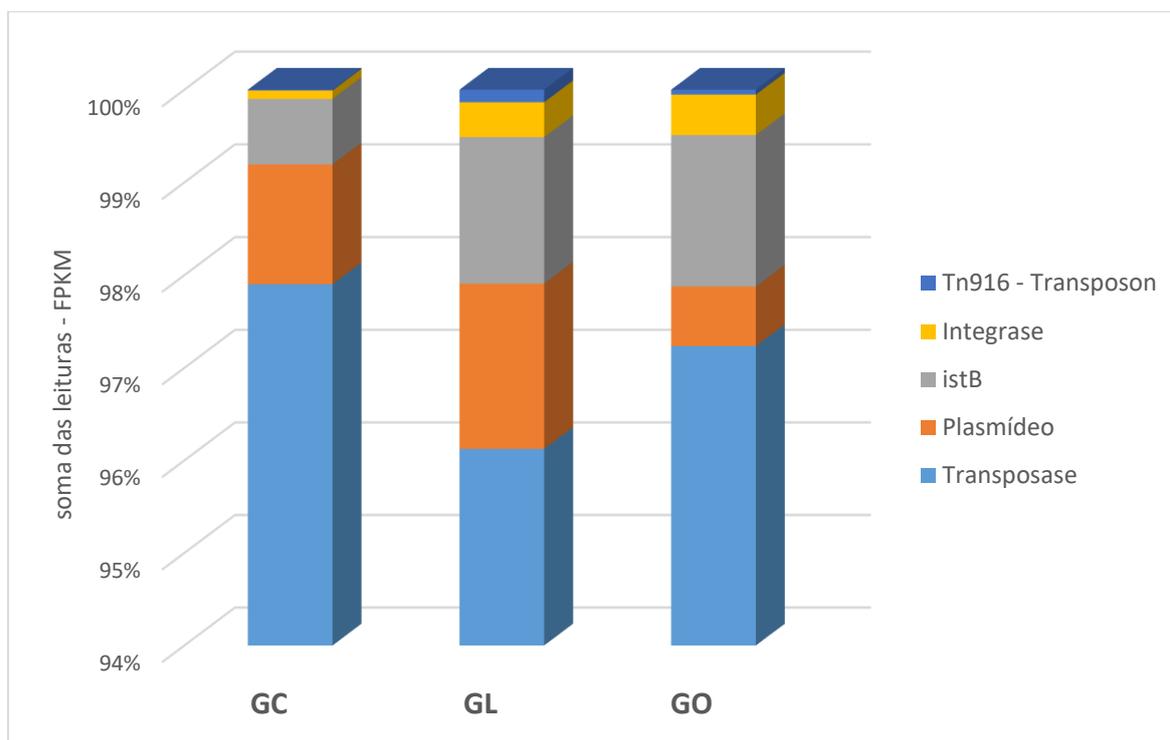
| Gene | Resistência | GC | GL | GO |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| mupA | Mupirocina | | ■ | |
| lsaA | Outros | | | ■ |
| bacA | Polimixinas | | ■ | |
| rosA | Polimixinas | | | ■ |
| rosB | Polimixinas | | | ■ |
| emrA | Quinolonas | ■ | | |
| mdtH | Quinolonas | ■ | | |
| mipA | Quinolonas | ■ | | |
| norA | Quinolonas | ■ | | |
| qacB | Quinolonas | | | ■ |
| QnrB19 | Quinolonas | | | ■ |
| qnrD1 | Quinolonas | | | ■ |
| sul2 | Sulfonamidas | ■ | | |
| emrK | Tetraciclinas | ■ | | |
| emrY | Tetraciclinas | | ■ | |
| tet(A) | Tetraciclinas | ■ | | |
| tet(C) | Tetraciclinas | | | ■ |
| tet(Y) | Tetraciclinas | ■ | | |
| tet(Z) | Tetraciclinas | ■ | | |
| tet44 | Tetraciclinas | | ■ | |
| dfrA12 | Trimetoprim | | | ■ |
| vanTC | Vancomicina | | ■ | |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, indica a presença do gene.

5.4.3 Pesquisa de elementos genéticos móveis (MGEs)

A partir do mapeamento de genes característicos de MGEs foi evidenciada a presença de 152 genes relacionados a tais elementos. Esses fragmentos de genes foram classificados e agrupados conforme a anotação dos genes no banco de dados NCBI em plasmídeos, integrases, transposases e transposon. Transposases foram os elementos mais frequentemente identificados somando-se a frequência nos três grupos, representando 97,2% dos genes mapeados, seguidas de plasmídeos e *istB* ambos representando 1,2% dos elementos identificados. A mesma distribuição de classes foi observada quando analisados cada grupo isoladamente (Figura 16) sendo as transposases mais frequentemente evidenciadas nos três grupos (GC 97,9%; GL 96,1%; GO 97,2%).

Figura 16 – Distribuição das principais classes de MGEs detectadas por grupo de produção.



GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico

A abundância dos genes de MGEs foi calculada considerando-se a soma das leituras após a normalização (FPKM). Não houve diferença estatística significativa da abundância de genes MGEs comparando-se o grupo orgânico vs grupo livre de antimicrobianos ($p = 1,00$) e o grupo livre de antimicrobianos vs convencional. Foi identificada diferença estatística significativa da abundância de genes quando comparados o grupo orgânico vs convencional ($p < 0,036$) (Tabela 22).

Tabela 22 – Distribuição das leituras normalizadas de MGEs. Os dados estão apresentados por mediana e amplitude interquartil (percentis 25 - 75).

| | GC (n=89) | GL (n=105) | GO (n=110) | p-valor(a) |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| FPKM | 6,30 (2,84 - 20,52) ^{bc} | 4,32 (1,63 - 15,55) ^{ab} | 4,10 (1,63 - 12,23) ^a | 0,037 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por milhão kilobase. (a) Teste Kruskal-Wallis. Nas linhas, os valores com diferentes letras sobrescritas (^{a,b}) indicam diferenças significativas ($p \leq 0,050$) entre os grupos avaliados com base no teste de post hoc de Dunn-Bonferroni.

Dos 152 genes evidenciados na pesquisa de MGEs, 54 foram mapeados nos três grupos, concomitantemente (Tabela 23). Quatorze genes foram mapeados somente no grupo

convencional, 17 no grupo livre de antimicrobianos e 20 foram mapeados apenas no grupo orgânico (Figura 17).

Tabela 23 – Genes de MGEs identificados, concomitantemente, nos três grupos de produção.
(Continua)

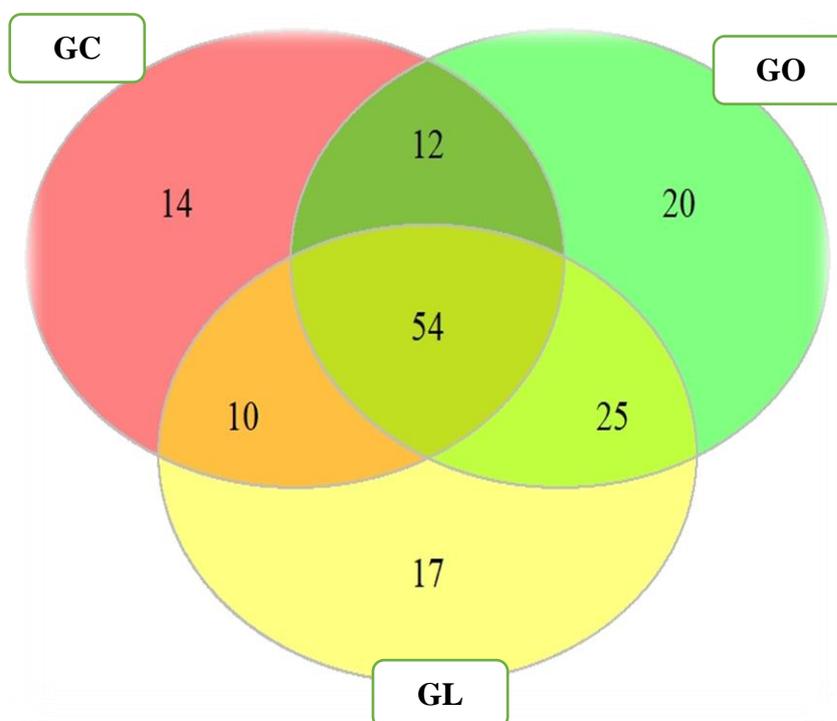
| Gene | Classe | GC (FPKM) | GL (FPKM) | GO(FPKM) |
|-------------------------|---------------|------------------|------------------|-----------------|
| IncFIB(pECLA)_1 | Plasmídeo | 56,06611 | 11,4022 | 19,09159 |
| IncFII(pCRY)_1 | Plasmídeo | 91,84052 | 15,24259 | 30,63428 |
| int2 | Integrase | 3,418263 | 8,63033 | 4,337549 |
| intI1 | Integrase | 30,07374 | 68,75002 | 94,03283 |
| IS26 | Transposase | 31,75791 | 16,48474 | 40,00757 |
| IS91 | Transposase | 4343,097 | 2249,754 | 2043,722 |
| ISCR1 | Transposase | 51,15916 | 8,854044 | 20,00441 |
| ISCrsp1 | Transposase | 2,170408 | 2,437778 | 1,634401 |
| istA | Transposase | 70,88507 | 229,8058 | 302,8221 |
| istA1 | Transposase | 10,86492 | 26,57539 | 35,33229 |
| istA11 | Transposase | 5,83328 | 6,267609 | 28,65049 |
| istA13 | Transposase | 29,0963 | 62,78647 | 48,11642 |
| istA15 | Transposase | 20,05596 | 20,00151 | 40,93043 |
| istA17 | Transposase | 3,450238 | 15,53427 | 21,39329 |
| istA2 | Transposase | 41,83816 | 3,333092 | 10,00933 |
| istA5 | Transposase | 2,992898 | 6,849946 | 6,782966 |
| istA7 | Transposase | 4,551708 | 7,934591 | 11,01282 |
| istB | istB | 263,5674 | 333,2042 | 393,4796 |
| rep13_5_rep(pMC524/MBM) | Plasmídeo | 4,692099 | 9,43459 | 4,329369 |
| rep21_14_rep(pKH21) | Plasmídeo | 22,56316 | 40,38398 | 9,613209 |
| rep21_2_rep(pNVH01) | Plasmídeo | 11,60331 | 17,84323 | 2,509461 |
| rep21_3_pS0385-3 | Plasmídeo | 45,56805 | 43,97438 | 10,50971 |
| rep21_4_repRC(pSK41) | Plasmídeo | 12,45428 | 21,55097 | 3,378817 |
| rep21_5_repRC(pGO1) | Plasmídeo | 21,12246 | 15,69584 | 1,072735 |
| rep21_6_rep(pBMSa1) | Plasmídeo | 10,51672 | 8,511123 | 5,012837 |
| rep21_7_rep(pWBG760) | Plasmídeo | 6,678427 | 0,641329 | 1,686574 |
| rep7_1_repC (Cassette) | Plasmídeo | 2,262856 | 1,412815 | 0,44767 |
| rep7_11_repD(pTZ4) | Plasmídeo | 2,841221 | 15,1715 | 2,231802 |
| rep7_12_rep (SAP060B) | Plasmídeo | 2,152188 | 2,319165 | 1,777596 |
| rep7_13_rep(pSBK203) | Plasmídeo | 4,423625 | 10,74611 | 2,691528 |
| rep7_2_CDS2(pC221) | Plasmídeo | 5,227374 | 20,16713 | 2,239201 |
| rep7_4_repD(pK214) | Plasmídeo | 2,282732 | 2,339064 | 0,981723 |
| rep7_7_rep(pKH7) | Plasmídeo | 2,198323 | 15,55723 | 11,03526 |
| repUS20_rep(pAVX) | Plasmídeo | 17,74771 | 3,231341 | 1,629653 |
| repUS5_CDS20(pETB) | Plasmídeo | 22,95124 | 2,193606 | 4,789089 |
| Tn916-orf16 | Transposon | 1,355791 | 0,3914 | 2,631068 |
| tniA | Transposase | 29,76856 | 153,9093 | 141,1536 |

(conclusão)

| Gene | Classe | GC (FPKM) | GL (FPKM) | GO (FPKM) |
|----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| tniB | Transposase | 17,72257 | 101,8992 | 115,9778 |
| tnpA | Transposase | 15559,41 | 8203,802 | 9651,987 |
| tnpA* | Transposase | 15559,41 | 8203,802 | 9651,987 |
| tnpA_ISKpn24 | Transposase | 275,0495 | 28,96164 | 67,53084 |
| tnpA_Tn3_like | Transposase | 14,96741 | 2,365541 | 12,23665 |
| tnpA1 | Transposase | 2,560593 | 5,379157 | 12,95873 |
| tnpA-1 | Transposase | 3,312888 | 20,17166 | 22,76475 |
| tnpA11 | Transposase | 12,18962 | 107,8715 | 103,3333 |
| tnpA13 | Transposase | 116,1875 | 314,7531 | 368,243 |
| tnpA1B1-IS1068 | Transposase | 20,52817 | 24,84952 | 31,15246 |
| tnpA1-IS981 | Transposase | 48,32092 | 117,539 | 59,94074 |
| tnpA2 | Transposase | 0,653198 | 1,261496 | 7,797225 |
| tnpA-2 | Transposase | 35,95805 | 77,49429 | 123,5315 |
| tnpA27 | Transposase | 2,687652 | 2,003035 | 7,758895 |
| tnpA2B2-ISLL6 | Transposase | 5,755803 | 7,757632 | 34,74512 |
| tnpA3 | Transposase | 6,300422 | 3,551836 | 3,839276 |
| tnpA4 | Transposase | 88,22708 | 225,6122 | 281,4641 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico, FPKM: fragmentos por milhão kilobase.

Figura 17 – Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de MGEs entre os diferentes grupos de produção.



Para a avaliação da diversidade alfa de MGEs os índices de Shannon e Simpson foram calculados (Tabela 24). O índice de diversidade de Simpson apresentou diversidade moderada para alta, considerando que tal índice varia de zero a um e valores mais próximos de um indicam maior diversidade, contudo, não houve diferença significativa ($p = 0,141$) para este índice entre os grupos. Considerando o índice de Shannon não foi observada diferença significativa da diversidade quando comparados os grupos convencional e orgânico ($p = 0,132$) e o grupo orgânico vs livre de antimicrobianos ($p = 1,00$). No entanto, foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos convencional e livre de antimicrobianos ($p = 0,048$).

Tabela 24 – Diversidade de MGEs conforme índices de Shannon e Simpson calculados por pool de sequenciamento.

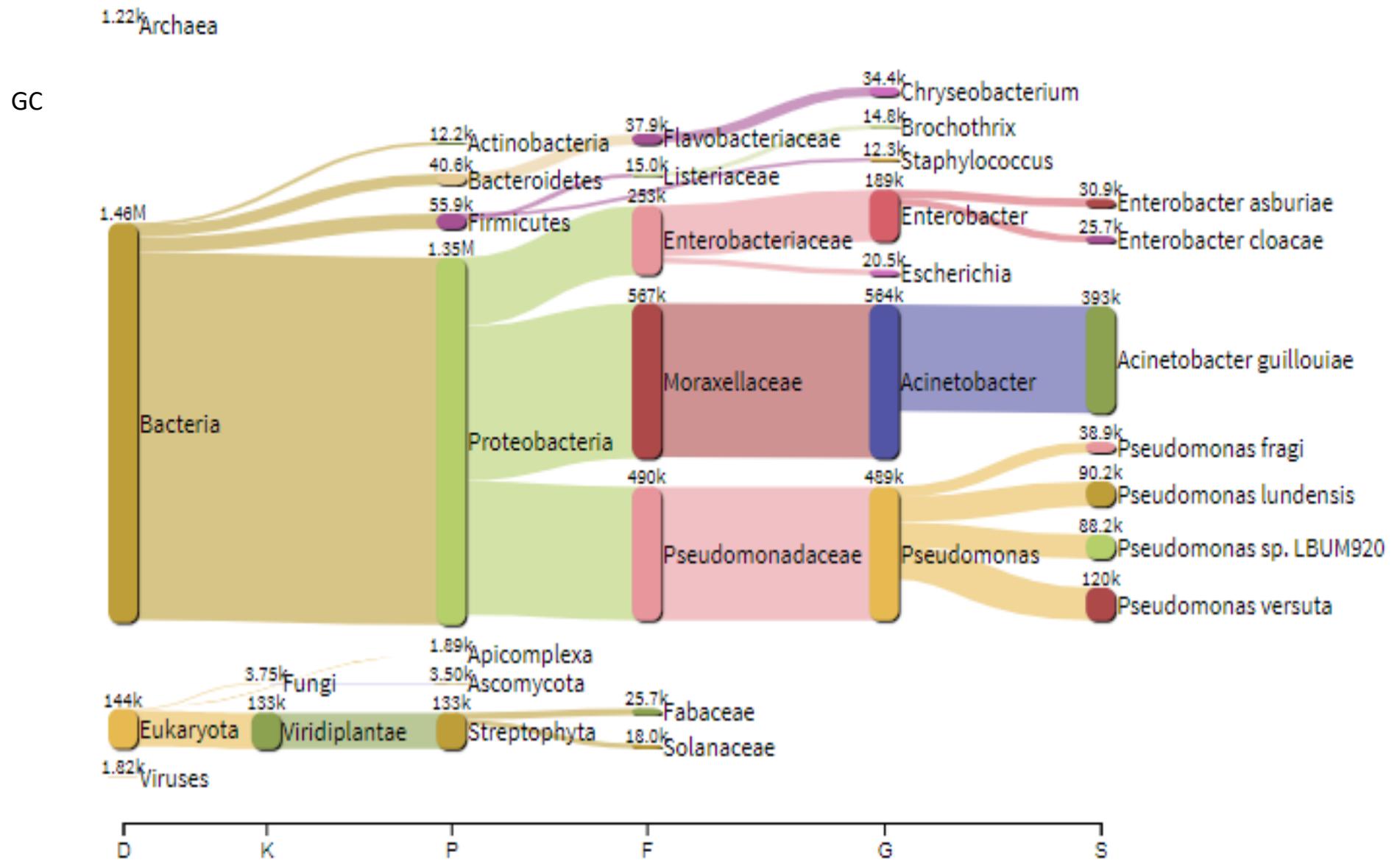
| Índice | GC | | | | GL | | | | GO | | | | p-valor (a) |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Shannon | 1,40 | 1,24 | 1,19 | 1,29 | 1,41 | 1,53 | 1,67 | 1,76 | 1,58 | 1,71 | 1,53 | 1,36 | 0,036 |
| Simpson* | 0,65 | 0,63 | 0,62 | 0,63 | 0,62 | 0,67 | 0,70 | 0,71 | 0,67 | 0,69 | 0,67 | 0,64 | 0,141 |

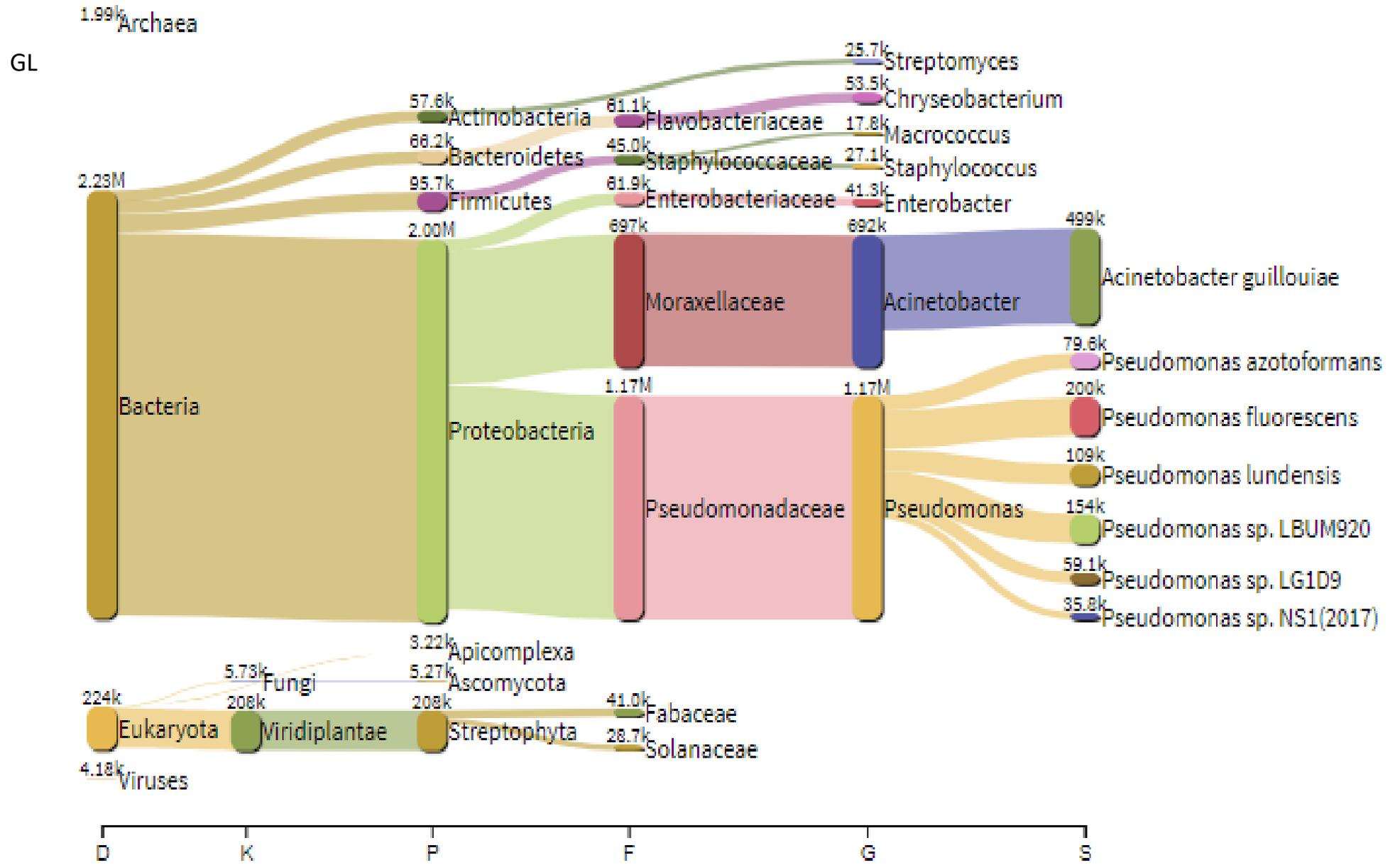
GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico. (a) Teste Kruskal-Wallis considerando $p \leq 0,050$. (*) Simpson (1-D).

5.4.4 Caracterização da comunidade bacteriana identificada nos lavados

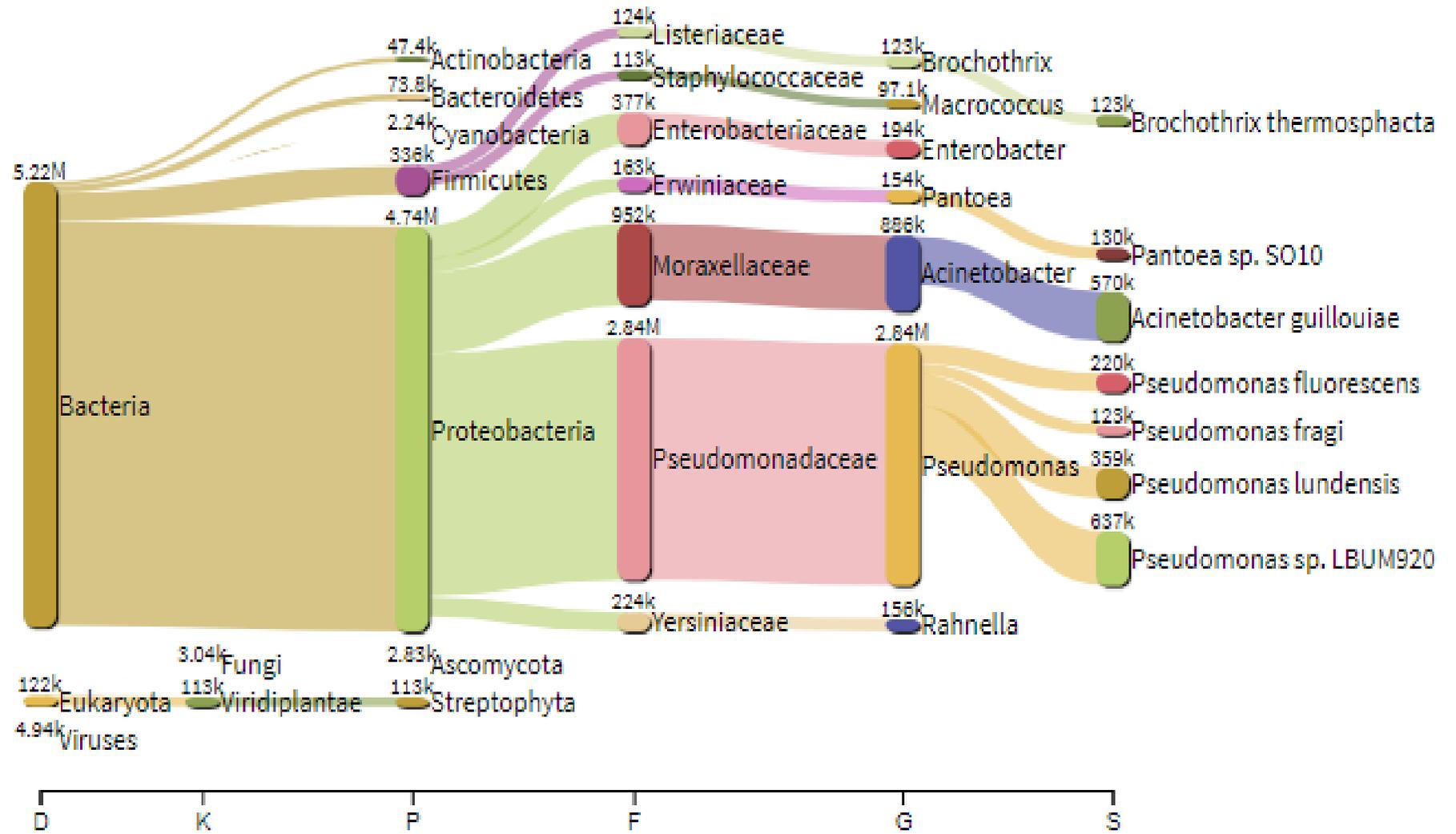
Após o mapeamento das sequências com a ferramenta Kraken2 os dados foram visualizados e analisados a partir da ferramenta Pavian. Nesta análise foram mapeadas, aproximadamente, 19 milhões de *reads* das quais, 8,8 milhões, somando-se os três grupos de produção, foram classificadas como pertencentes ao domínio Bacteria. Do total de sequências classificadas a partir desta abordagem, sequências bacterianas representaram 94% das sequências microbianas classificadas. Um total de 38 filós e 72 classes bacterianas foram identificadas. Na Figura 18 está apresentado um panorama geral da classificação taxonômica verificada nos três grupos de produção.

Figura 18 – Diagrama de Sankey gerado pelo Pavian apresentando a distribuição e abundância taxonômica bacteriana nos três grupos de produção GC, GL e GO.



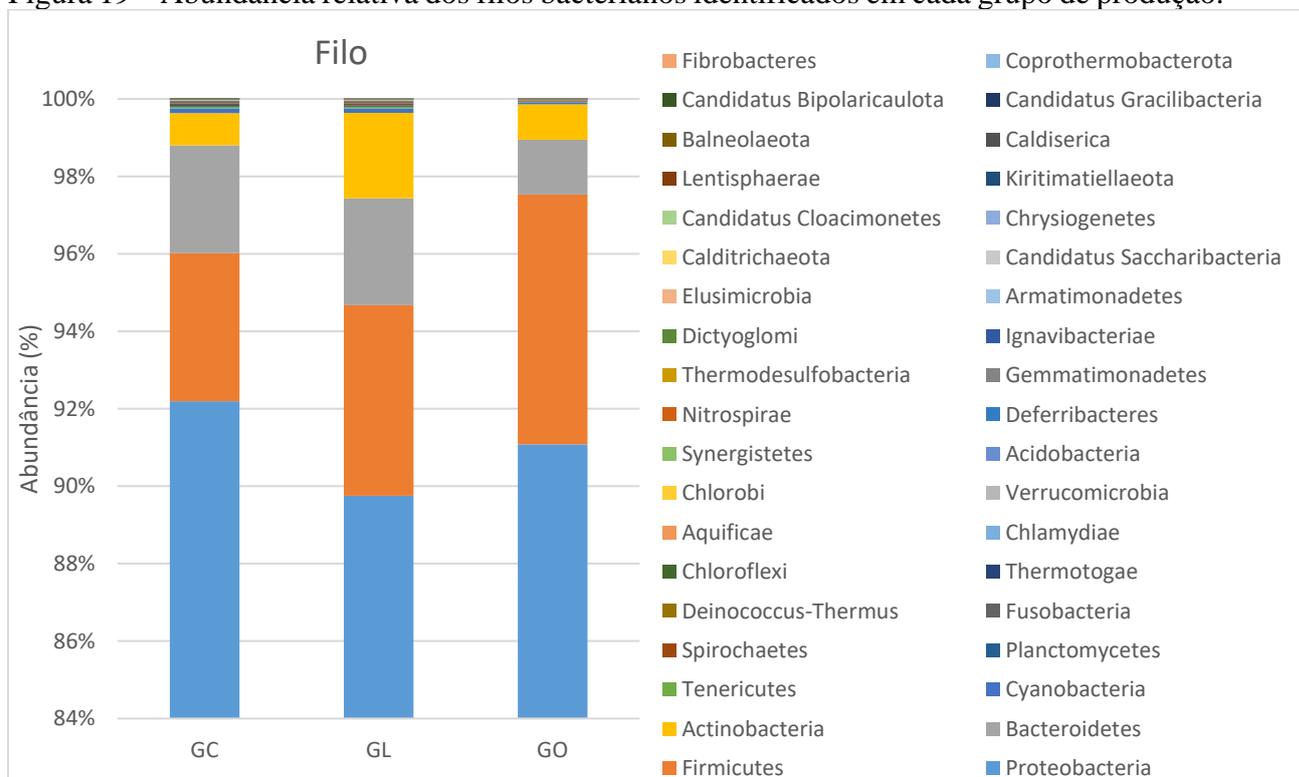


GO 1.42k Archaea



Os principais filos identificados (Figura 19), representando 99,7% dos filos bacterianos, foram Proteobacteria (90,9%), Firmicutes (5,6%), Bacteroidetes (1,9%) e Actinobacteria (1,2%). Tal distribuição foi similar comparando-se a abundância relativa de filos nos três grupos de produção individualmente. Para o cálculo da abundância absoluta foram consideradas as somas das leituras dos filos classificados em cada grupo, não houve diferença estatística significativa na abundância absoluta entre os grupos ($p = 0,966$) considerando um nível de significância de 95%.

Figura 19 – Abundância relativa dos filos bacterianos identificados em cada grupo de produção.

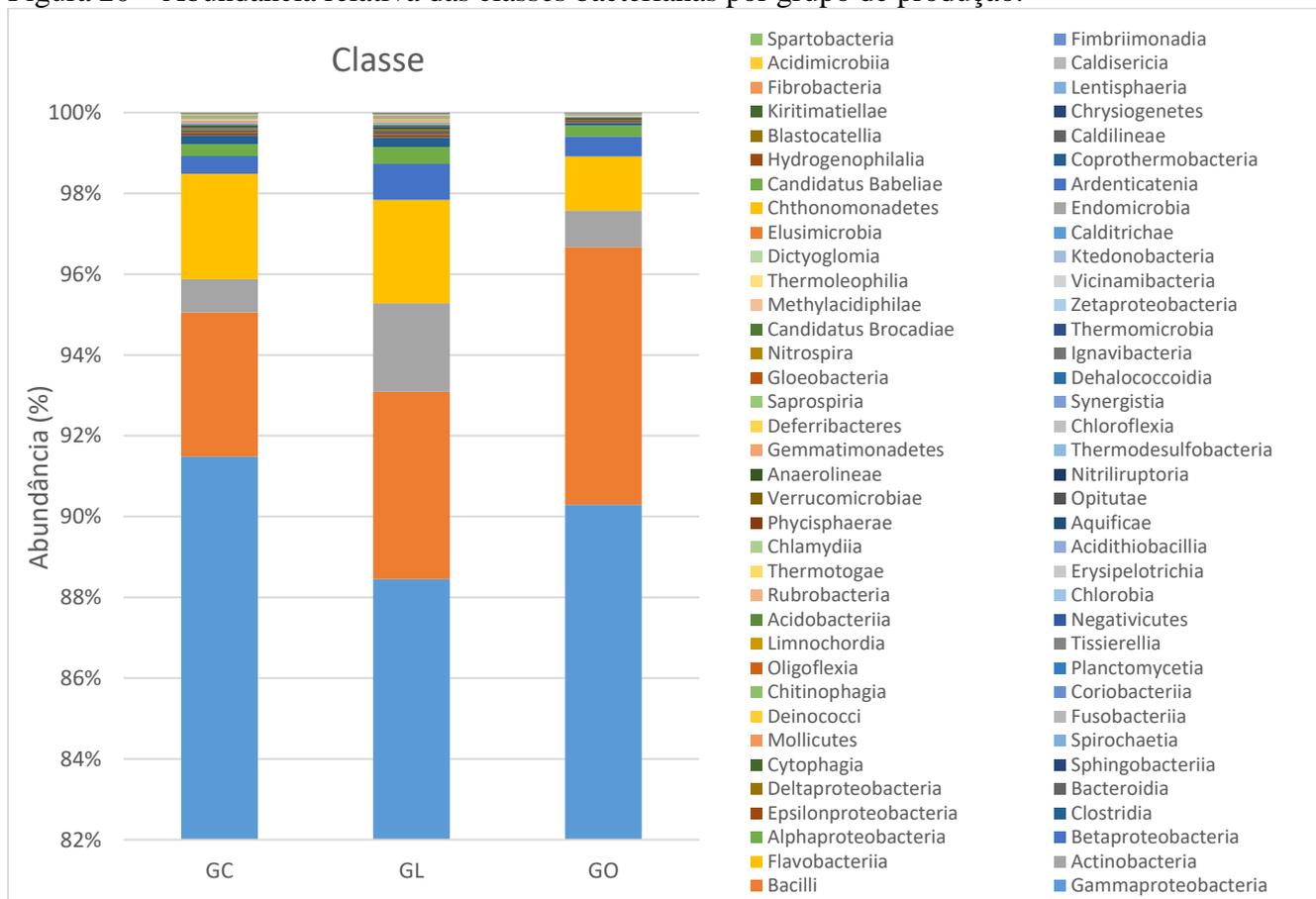


GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Gammaproteobacteria (90,03%), Bacilli (5,48%), Flavobacteria (1,84%), Actinobacteria (1,20%) e Betaproteobacteria (0,58%) foram as cinco classes mais abundantes identificadas nos três grupos de produção (Figura 20). Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,397$), a um nível de significância de 95%, considerando a soma das classes identificadas entre os três grupos de produção. A classe predominante nos três grupos foi Gammaproteobacteria representando 91,4% das classes identificadas no grupo convencional, 88,4% no grupo livre de antimicrobianos e 90,2% no grupo orgânico; seguida da classe Bacilli com 3,5%, 4,6% e 6,3%, respectivamente, em cada grupo. A classe Flavobacteria foi

identificada em maior quantidade nos grupos GC (2,6%) e GL (2,5%) se comparada com o grupo orgânico no qual a classe correspondeu a 0,9% do total de classes do grupo.

Figura 20 – Abundância relativa das classes bacterianas por grupo de produção.



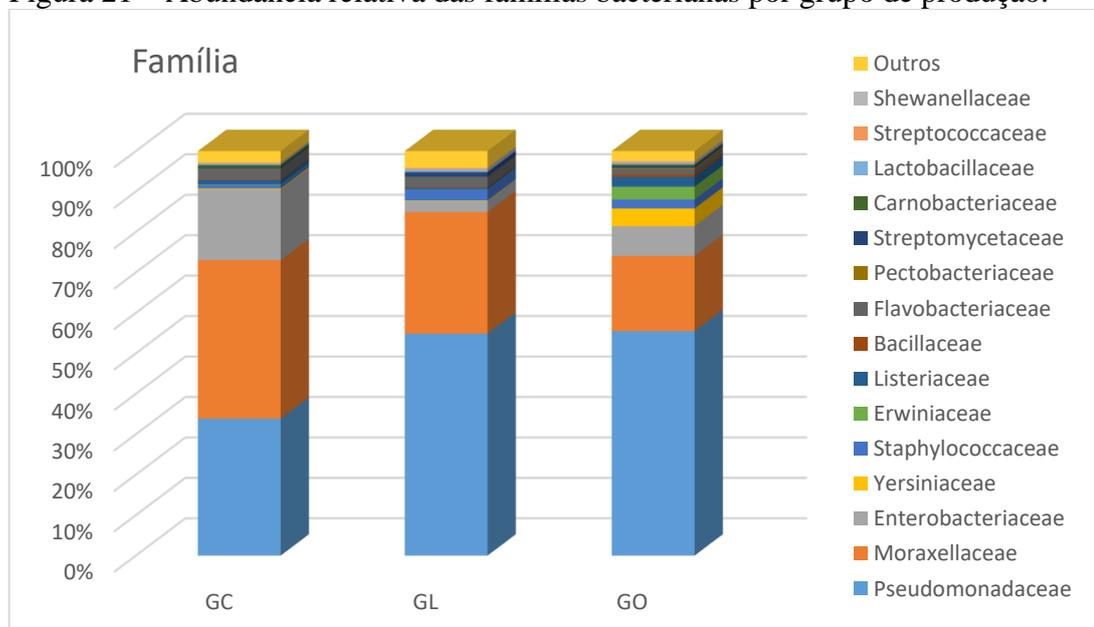
GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

A distribuição da abundância relativa a nível de família está apresentada na Figura 21. Um total de 351 famílias bacterianas foram identificadas. Pseudomonadaceae (51,7%), Moraxellaceae (24,8%), Enterobacteriaceae (7,9%), Yersiniaceae (2,6%) e Staphylococcaceae (2,0%) foram as cinco principais famílias identificadas considerando-se a abundância relativa da soma dos três grupos.

Analisando-se os grupos individualmente foi possível verificar uma alternância na abundância relativa das cinco principais famílias identificadas por grupo de produção. Pseudomonadaceae, Moraxellaceae e Enterobacteriaceae se mantiveram como as três principais famílias identificadas nos grupos GL e GO representando 87,5% e 71,2% do total de famílias identificadas nos dois grupos, respectivamente. Enquanto no GC as três principais famílias

identificadas foram Maraxellaceae (39,1%), Pseudomonadaceae (33,8%) e Enterobacteriaceae (17,4%), essas três famílias representaram 90,3% do total de famílias identificadas neste grupo de produção.

Figura 21 – Abundância relativa das famílias bacterianas por grupo de produção.



GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

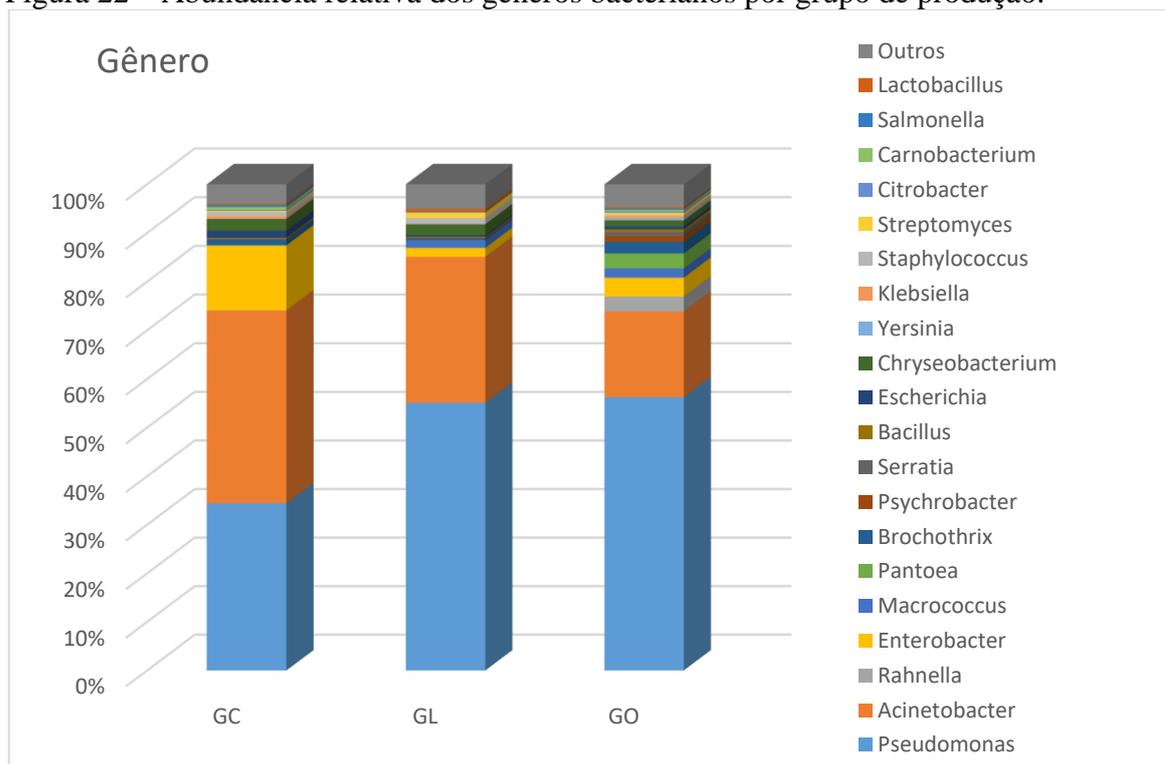
Quanto à classificação a nível de gênero, foram identificados 1.246 gêneros bacterianos, somando-se os três grupos de produção, 1.227 no GC, 1.238 no GL e 1.241 no GO (Tabela 25). Calculando-se a abundância absoluta dos gêneros entre os grupos, foi observada diferença estatística significativa (p valor $< 0,001$) entre os três grupos com nível de significância de 95%. A abundância relativa desses gêneros está ilustrada na Figura 22. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enterobacter* representando 54,0%, 22,9% e 3,7%, respectivamente, foram os gêneros mais abundantes relativamente somando-se os três grupos de produção. Quando analisados os grupos individualmente, observa-se que os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* ainda são predominantes nos grupos GL (55,1% e 29,9%) e GO (56,2% e 17,5%) o que não se manteve no grupo GC no qual a abundância relativa dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* foram de 39,6% e 34,4%, respectivamente.

Tabela 25 – Distribuição absoluta das leituras da classificação de gêneros. Os dados estão apresentados por mediana e amplitude interquartil (percentis 25 - 75).

| | GC (n=1.227) | GL (n=1.238) | GO (n=1241) | p-valor(a) |
|-------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------|
| Reads | 11 (5 - 28) ^a | 18 (9 - 46) ^b | 25 (13 - 73) ^c | < 0,001 |

GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antimicrobianos, GO: grupo orgânico. (a) Teste Kruskal-Wallis. Nas linhas, os valores com diferentes letras sobrescritas (^{a,b,c}) indicam diferenças significativas ($p \leq 0,050$) entre os grupos avaliados com base no teste de *post hoc* de Dunn-Bonferroni.

Figura 22 – Abundância relativa dos gêneros bacterianos por grupo de produção.



GC: grupo convencional, GL: grupo livre de antibióticos, GO: grupo orgânico.

Quanto à identificação a nível de espécie, foram identificadas 4.792 espécies bacterianas somando-se a presença nos três grupos de produção. Dessas, 1.387 espécies estiveram presentes, concomitantemente, nos três grupos.

Foram identificadas 179 espécies de *Pseudomonas* somando-se a frequência da espécie nos três grupos. A frequência relativa de *reads* mapeadas de *E. coli*, micro-organismo eleito como indicador de resistência neste estudo, foi de 1,42 % no GC, 0,29% no GL e 0,63% no GO.

6 DISCUSSÃO

A administração de antimicrobianos em grande escala para animais destinados à alimentação humana tem sido foco de debates e pesquisas em função da possibilidade de seleção e disseminação de bactérias resistentes. Estudos demonstram a presença de genes de resistência em bactérias isoladas em diversos elos da cadeia de produção de proteína animal, sugerindo uma elevada capacidade de transferência horizontal desses genes e os animais de produção como seus potenciais reservatórios (DAME-KOREVAAR et al., 2019; MA et al., 2020; OSMAN et al., 2018; PARK et al., 2019; PROJAHN et al., 2018; VAN GOMPEL et al., 2020).

Instituições governamentais e indústria têm buscado alternativas para reduzir o uso de antimicrobianos nos sistemas de produção animal a fim de barrar o aumento da resistência bacteriana atrelada a esses sistemas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020, 2015). Entre essas, produtores têm lançado mão de sistemas alternativos de criação como aqueles de produção orgânica ou livre de antimicrobianos, os quais têm em comum as restrições no uso dessas drogas.

Aliado a isso, sistemas convencionais de produção intensiva têm sido questionados em relação ao bem-estar dos animais e aos impactos na saúde humana, animal e ao meio ambiente frente às substâncias utilizadas na criação, gerando a necessidade de mudanças nesses sistemas ou alternativas para satisfazer um consumidor atento ao que chega à sua mesa. Isso tem refletido no crescimento, ano após ano, de sistemas alternativos para a produção de alimentos (BIRADAR et al., 2011; CRANDALL et al., 2009; ROSSA; STERTZ; MACEDO, 2012).

Todavia, para o consumidor final o fato de animais de produção serem possíveis carreadores de bactérias resistentes a antimicrobianos não parece ser a principal motivação para a mudança no comportamento alimentar e a busca por alimentos alternativos. A percepção de que os alimentos orgânicos são mais saudáveis, seguros e nutritivos são as principais razões destacadas para o consumo desses produtos (CRANDALL et al., 2009; GALGANO et al., 2016; ŚREDNICKA-TOBER et al., 2016; VAN LOO et al., 2010; WONG; AINI, 2017; XIE et al., 2015). Porém, ainda existem lacunas quanto às diferenças nutricionais e de segurança desses alimentos quando comparados aos alimentos de sistemas convencionais.

A partir disso, o presente estudo visou investigar se havia diferença em marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos presentes em um produto largamente

consumido no Brasil – a carne de frango – comercializado com selo de orgânico ou livre de antibióticos em relação ao produto convencional. Para tanto, uma amostra representativa de frangos congelados embalados na indústria, pertencentes a esses três grupos, foi adquirida no comércio varejista e analisado sob diferentes enfoques.

O primeiro aspecto abordado, apesar do objetivo desse estudo não estar diretamente relacionado à determinação dos padrões microbiológicos da matriz estudada, foi a enumeração de *E. coli* e pesquisa de *Salmonella* sp. (dados não apresentados). Das 72 amostras analisadas, todas tiveram ausência de *Salmonella* sp. e baixas contagens de *E. coli*, não havendo diferença entre grupos.

Com relação à segurança alimentar, estima-se que, praticamente, uma a cada 10 pessoas adoça todos os anos no mundo devido à ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos, entre os quais as bactérias desempenham um papel importante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A carne de frango está entre os dez alimentos mais envolvidos em surtos alimentares no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019); outrossim, sua importância vai além do consumo propriamente dito, uma vez que pode ser responsável por contaminação cruzada dentro das residências, o principal local de ocorrência das DTAs (DEPOORTER et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Dentre os agentes etiológicos envolvidos, *Salmonella* sp. e *E. coli* estão entre os principais micro-organismos em surtos com causa identificada no país entre os anos de 2009 e 2018, sendo identificados em 23,4% e 11,3% dos casos, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Além disso, o monitoramento de *E. coli* em alimentos, como indicador de higiene, está previsto na legislação brasileira por meio da Resolução - RDC N° 331/2019 e Instrução Normativa n° 60/2019 (BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019c, 2019b), tendo como limite estabelecido 5×10^3 UFC.g⁻¹ para amostra indicativa de carne de frango.

O fato de que nenhuma das amostras analisadas apresentou contagens de *E. coli* acima do estabelecido pela normativa e 37,5% delas apresentaram contagens menores que 1 UFC.g⁻¹ demonstrou que qualidade higiênica dos produtos analisados foi satisfatória. O status higiênico do produto está, em boa parte, relacionado com seu processamento na indústria. O processo de abate industrial de frangos é composto de diversas etapas que visam a garantia da qualidade e segurança do produto final. Apesar da possibilidade de falhas nesses processos acarretarem em contaminação do produto e aumento na carga bacteriana (AE KIM et al., 2017; MPUNDU et al., 2019), a implantação de boas práticas de fabricação e etapas como o resfriamento podem

reduzir significativamente as contagens médias de micro-organismos, refletindo na baixa contaminação microbiológica (DIAS et al., 2017), como a observada nas amostras em estudo.

A partir do primeiro enfoque abordado, é possível inferir que o produto analisado estava apto ao consumo humano e, portanto, tratava-se de um alimento que não apresentava impedimento sanitário para ser comercializado, ser adquirido pelo consumidor e entrar em contato com manipuladores de alimentos e ambiente de preparo dos mesmos. Sendo assim, avançou-se para o enfoque principal do estudo relacionado aos marcadores de resistência a antimicrobianos nos três grupos de frangos congelados analisados: convencionais (GC); com certificação de livre de antibióticos (GL); e com certificação de orgânico (GO).

Além de ser um indicador de higiene de processos na indústria de alimentos, *E. coli* também é considerada o micro-organismo indicador para a determinação e monitoramento de resistência a antimicrobianos para bactérias Gram negativas (ECDC; EFSA; EMA, 2017). Neste sentido, 216 isolados de *E. coli* obtidos de amostras dos três grupos foram testados frente a 12 antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana e/ou amplamente utilizados na produção animal.

Cinquenta e nove por cento (128/216) das cepas de *E. coli* genérica apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano independente do grupo. Tal frequência era esperada, uma vez que no estudo piloto, conduzido para delineamento do tamanho de amostra, frequências de resistência de até 47% frente à tetraciclina – antimicrobiano escolhido para o cálculo de amostra - haviam sido observadas (Apêndice B). Ainda, deve-se considerar que a resistência bacteriana é um atributo natural das bactérias e que este garante a sua sobrevivência e manutenção nos diferentes nichos ecológicos (D’COSTA et al., 2011; GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017).

As maiores frequências de cepas resistentes reportadas neste estudo foram frente à tetraciclina (32,4%), trimetoprima (28,2%), ampicilina (25,0%) e ácido nalidíxico (18,5%). Apesar da tetraciclina e dos betalactâmicos terem seu uso como promotor de crescimento proibido no Brasil desde 2009 (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009), esses fármacos são frequentemente utilizados de forma terapêutica e são mencionados, junto com polipeptídeos, aminoglicosídeos e aminociclitéis, macrolídeos e lincosamidas, florfenicol, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas e ionóforos, dentre os antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de aves doentes (HOFACRE; FRICKE; INGLIS, 2013; LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

Estudos realizados com *E. coli* isoladas da cadeia avícola demonstram frequências de resistência aos antimicrobianos bastante diversa. Porém, ampicilina, tetraciclina e ácido nalidíxico são frequentemente reportados com as maiores taxas de resistência. Ampicilina (76,6%), tetraciclina (68,4%), ácido nalidíxico (43,6%), sulfa/trimetoprima (40,1%) e amoxicilina/clavulanato (35,7%) foram os antimicrobianos com maior resistência descrita no estudo conduzido por Musa et al. (2020). Em estudo semelhante ao nosso, porém avaliando amostras de ceco de frangos de três sistemas de produção, foram observadas taxas de resistência igual ou superior à 50% para ampicilina, cefalosporinas de primeira geração, sulfonamidas, ácido nalidíxico e tetraciclina, independente do sistema de produção (PESCIAROLI et al., 2020). Menores taxas foram observadas na Austrália em 2016, com amostras representativas dos maiores produtores de frangos no país, neste caso a resistência à tetraciclina, ampicilina e sulfa/trimetoprima foram de 19,4%, 14,01% e 8,7%, respectivamente (ABRAHAM et al., 2019). No Canadá, a resistência à tetraciclina foi descrita em 43% das amostras fecais de frangos (VARGA et al., 2019), em 81,4% dos isolados de *E. coli* em frangos da Zâmbia (PHIRI et al., 2020) e em 95% de *E. coli* isoladas de frangos com lesões de colibacilose no Irã (JAHANTIGH et al., 2020). A resistência à ampicilina foi reportada em 36,58% em estudo realizado por Elumba; Allera e Taganas (2018) analisando *E. coli* recuperada de cortes de frango.

Mesmo comparando com estudos realizados no Brasil (RABELLO et al., 2020), as frequências de resistência tendem a ser menores no nosso estudo. A resistência à tetraciclina (70%-91%), ácido nalidíxico (61% - 78%) e ampicilina (20% - 67%) foi bastante superior em estudo realizado no Brasil analisando amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango nos anos de 2007 e 2013; tetraciclina, além de apresentar as maiores frequências de isolados resistentes, apresentou incremento significativo desse índice ao longo do tempo (KOGA et al., 2015).

Há evidências de que o aumento no volume de uso de antimicrobianos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de resistência (GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017; MANYI-LOH et al., 2018; XIONG; SUN; ZENG, 2018). Além disso, consequências adversas para a saúde humana, como aumento na frequência e gravidade de infecções, e falhas no tratamento podem estar relacionadas a organismos resistentes resultantes, principalmente, do uso não-humano de antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Considerando que a pressão de seleção pode beneficiar a multiplicação de indivíduos

resistentes, espera-se que, de alguma forma, os sistemas de produção cujo uso de antimicrobianos seja limitado module tal multiplicação, reduzindo populações de bactérias resistentes. Da mesma forma, espera-se que esse fato tenha reflexo na microbiota presente no produto ofertado para o consumidor, uma vez que o alimento é a ligação mais consistente em termos de transferência de bactérias carreando genes de resistência entre os animais de produção e os humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Contudo, essa modulação nem sempre é observada. No presente estudo, a diferença entre os grupos de amostras foi observada de forma pontual; e nem sempre a restrição do uso de antibióticos certificada pelo selo de origem da produção esteve relacionada à menor resistência. Uma possível limitação do presente estudo é o fato das amostras analisadas serem produtos comercializados, ou seja, não foram colhidas de aves vivas no sistema de produção propriamente dito. Sendo assim, a contaminação cruzada do produto durante seu processamento no abatedouro não pode ser totalmente descartada, uma vez que pelo menos no caso de GL, as plantas de abate não são exclusivas. Mesmo considerando essa limitação, espera-se que a influência do manejo na criação tenha reflexo no produto final, uma vez que, do ponto de vista da saúde pública, aqui reside o aspecto mais relevante. Além disso, o consumidor possivelmente adquire o produto certificado, com maior custo, na expectativa de que haja diferença no sentido de menor risco de contato com substâncias e micro-organismos nocivos à saúde.

Na avaliação de *E. coli* como indicador de resistência a antimicrobianos pôde-se observar: para o MIC₅₀, considerando todos os antimicrobianos testados, esse valor se manteve abaixo tanto do ponto de corte clínico (CLSI, 2020) quanto do ponto de corte epidemiológico (ECOFF) nos três grupos de amostras. Em relação ao MIC₉₀ alguns antimicrobianos (NAL, AMP e TET) apresentaram este índice acima do ponto de corte clínico e epidemiológico independente do grupo. Porém, também foram observadas diferenças em relação ao MIC₉₀ de alguns antimicrobianos entre os grupos de amostras. Contrariando a hipótese de que o uso de antimicrobianos selecionaria cepas resistentes, os grupos com restrição no uso de antimicrobianos (GL e GO) apresentaram MIC₉₀ acima do ponto de corte clínico para gentamicina (GL e GO) e para cefotaxima (GL).

Apesar da restrição do uso de antimicrobianos durante o período de produção das aves alojadas em sistemas livre de antimicrobianos e/ou em sistemas orgânicos certificados, existem exceções como a introdução de aves de um dia (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011) que podem expor esses animais aos

antimicrobianos mesmo antes do alojamento. Entre essas exposições pode ser citada a vacinação *in ovo* na qual antimicrobianos como a gentamicina e o ceftiofur são administrados associados a vacinas amplamente utilizadas na avicultura, como a vacina contra a doença de Marek (DUNN; GIMENO, 2013).

A resistência à gentamicina também foi observada em estudo realizado por Davis et al. (2018) avaliando frangos com e sem restrição de uso de antimicrobianos. Porém, diferente das nossas observações, a resistência à gentamicina foi maior no grupo convencional. Nos estudos realizados por Much et al. (2019) e Pesciaroli et al. (2020) não foram observadas diferenças de resistência frente a gentamicina entre amostras de grupo orgânico e convencional. Contrariando os estudos anteriores, a resistência à gentamicina não foi observada em nenhum dos isolados de *E. coli* analisados por Sanchez et al. (2020), independente da categoria de produção, demonstrando que tal resistência pode não estar relacionada somente ao uso ou restrição de uso de antimicrobianos.

Quando as razões de prevalências (RP) de resistência foram avaliadas, diferenças pontuais entre os grupos de amostras foram observadas pela aplicação do modelo de regressão de Poisson. Em relação à ampicilina, um dos três antimicrobianos com maior frequência de resistência, a razão de prevalência de resistência no grupo livre de antimicrobianos foi de 0,56 vezes a razão de prevalência do grupo convencional, enquanto essa razão foi de 0,44 vezes no grupo orgânico comparado com o convencional. Em outras palavras, e avaliando as frequências absolutas desses isolados, observa-se que tal prevalência é maior no grupo convencional. Da mesma forma, razão de prevalência de resistência ao ácido nalidíxico em GO foi de 0,47 vezes àquela de GC. Por outro lado, e concordando com os dados apresentados para MIC₉₀, a razão de prevalência de resistência frente à gentamicina nos grupos GL e GO foi de 4,5 e 2,7 vezes a RP de resistência do grupo convencional, sendo estatisticamente significativa apenas para GL; portanto há maior frequência de resistência nas amostras desse grupo. Nos demais casos, o modelo de Poisson não detectou diferença significativa na razão de prevalência.

Quando comparadas às médias de cepas resistentes entre os três grupos, não foi observada diferença entre eles. Entretanto, a média de resistentes em GO frente aos outros dois grupos (GC e GL) apresentou valor de *P* limítrofe ($p < 0,06$), podendo indicar uma tendência de menores médias de resistência nesse grupo de amostras. Essa diferença se confirma quando verificada a frequência de cepas totalmente suscetíveis aos antimicrobianos testados, para as quais GO apresentou maior frequência quando comparado ao GC, sendo sua razão de

prevalência de totalmente suscetíveis 1,67 vezes a de GC. Além disso, a frequência de cepas multirresistentes (MDR) foi maior para os isolados de GC; nesse caso GO apresentou 0,52 vezes a prevalência de MDR em relação a GC. Demonstrando, assim, uma possível pressão de seleção para bactérias MDR possivelmente relacionada com a ausência de restrição no uso de antimicrobianos permitidos por lei na avicultura convencional.

Portanto, a comparação da prevalência de resistência entre grupos indica que, tomando GC como referência, houve diferença no sentido de maior ocorrência de cepas de *E. coli* totalmente suscetíveis, menor frequência de MDR, e menor número de cepas resistentes à ampicilina e ácido nalidíxico em GO em comparação com GC. Enquanto em GL apenas a menor frequência de resistentes à ampicilina em relação a GC foi demonstrada.

De modo geral, dados da literatura indicam maior consistência de padrões mais elevados de resistência entre amostras de grupos convencionais e livres de antimicrobianos quando comparados aos grupos orgânicos (MUSA et al., 2020; PESCIAROLI et al., 2020; SANCHEZ et al., 2020). A principal diferença entre eles estaria relacionada às cepas multirresistentes para as quais, corroborando com nossos resultados, frequentemente é menor em amostras provenientes de sistemas de produção orgânica (DAVIS et al., 2018; MUCH et al., 2019; MUSA et al., 2020; PESCIAROLI et al., 2020). A frequência maior de cepas de *E. coli* totalmente suscetíveis para amostras de sistemas orgânicos, 43,3% vs 16,7%, também foi descrita por Much et al. (2019). O fato desses estudos serem, na sua maioria, realizados com cepas de *E. coli* isoladas de amostras de conteúdo intestinal de frangos nas granjas e/ou abatedouros indica que, apesar da possível limitação do nosso estudo quanto à extrapolação dos resultados para o tipo de sistema de produção, devido à natureza das amostras (carcaças embaladas), nossos resultados concordam com o padrão de resistência (MDR e Tsus) observado para os diferentes sistemas de produção.

Um aspecto positivo em termos de resistência bacteriana em saúde pública foi o fato de que cepas de *E. coli* resistentes à colistina, meropenem e tigeciclina não foram detectadas. Esses antimicrobianos fazem parte da lista de antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana e sua inclusão se dá ao fato de serem medicamentos de última escolha no tratamento de infecções graves em humanos causadas por micro-organismos multirresistentes e/ou resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A resistência à colistina tem sido reportada em diversos estudos, inclusive na cadeia de produção avícola, com frequências que variam de 79,8% (IRRGANG et al., 2016) a 1,8% (PERRIN-GUYOMARD et al., 2016; PESCIAROLI et al., 2020). Além disso, animais de produção têm sido sugeridos como possíveis reservatórios e disseminadores de genes que conferem resistência a esta classe de antimicrobianos (BITRUS; CHUANCHUEN; LUANGTONGKUM, 2018; GUENTHER et al., 2017; IRRGANG et al., 2016; MONTE et al., 2017; PERRIN-GUYOMARD et al., 2016; YASSIN et al., 2017; ZHANG et al., 2018). O gene *mcr-1*, marcador de resistência à colistina, já foi identificado em isolados de *E. coli* de carne de frango no Brasil (MONTE et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2020) e em outros países (AMIN et al., 2020; IRRGANG et al., 2016; ISLAM et al., 2020; MACIUCA et al., 2019; TRUNG et al., 2017).

A restrição no uso deste fármaco como promotor de crescimento em animais produtores de alimentos vem demonstrando resultados positivos. Exemplo disso é apresentado em estudo realizado na China, no qual a prevalência de *E. coli* resistente à colistina passou de 34% para 5% em suínos e de 18% para 5% em frangos após a restrição de uso do fármaco como promotor de crescimento em animais (WANG et al., 2020). Frequências de resistência à colistina de 2,8% foram reportadas em amostras de fezes de suínos e aves no Uruguai, utilizando metodologia de isolamento com seleção para o fármaco; dessas, apenas uma cepa positiva foi isolada de frango (COPPOLA et al., 2020). A resistência à colistina e ao meropenem não foram detectadas em *E. coli* isoladas de frango na Áustria (MUCH et al., 2019). Da mesma forma, a resistência à colistina não foi observada em incubatórios de aves no Egito (OSMAN et al., 2018). Semelhante aos nossos resultados, a ausência de isolados resistentes à colistina, meropenem e tigeciclina também foi observada por Dandachi et al. (2018) em estudo nacional que avaliou a resistência bacteriana em 49 granjas avícolas no Líbano. A ausência de cepas resistentes à colistina observada em nosso estudo pode estar relacionada à restrição do uso deste princípio ativo, uma vez que, desde 2016, o fármaco não pode ser utilizado na cadeia de produção animal como melhorador de desempenho.

No presente estudo, as frequências de resistência às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima e ceftazidima) em *E. coli* estiveram abaixo de 10%, exceto em GL onde 13,9% das cepas foram resistentes à cefotaxima. A resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração podem ser um indicativo para a presença de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e/ou cepas produtoras de AmpC. Esses micro-organismos desempenham um papel

importante em saúde pública uma vez que o tratamento de infecções causadas por essas bactérias também é limitado. As ESBL são capazes de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, enquanto as beta-lactamases do tipo AmpC conferem resistência à maioria das cefalosporinas, incluindo as cefalosporinas de amplo espectro, como a ceftazidima, a cefotaxima e a ceftriaxona, bem como as cefamicinas, como a cefoxitina (BUSH; BRADFORD, 2019).

Além disso, animais de produção, especialmente frangos, têm sido considerados importantes reservatórios dessas bactérias (DAME-KOREVAAR et al., 2019; PROJAHN et al., 2018). Devido à sua importância em saúde pública e o aumento da sua prevalência nos últimos anos (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017), realizamos a pesquisa de bactérias produtoras de ESBL e AmpC utilizando a abordagem de detecção seletiva desses microorganismos, geralmente presentes em baixa quantidade nas amostras, seguindo protocolos adotados internacionalmente (EFSA, 2019; EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2017; HASMAN et al., 2018).

A partir do enriquecimento não seletivo, seguido da detecção seletiva, 28 carcaças foram positivas para *E. coli* produtoras de ESBL, o equivalente a 39% do total de carcaças analisadas (9/24 convencional, 9/24 livre de antimicrobianos e 10/24 orgânico). Dessas, oito carcaças (GC n=3, GL n=1; e GO n=4), apresentaram o perfil fenotípico ESBL/pAmpC representando 23,2% (17/73) das cepas ESBL.

A frequência de *E. coli* produtora de ESBL pode variar de acordo com a metodologia utilizada e a natureza das amostras. Porém, sua detecção na cadeia de produção de aves e carne de frango tem sido frequentemente reportada independente da restrição de uso de antimicrobianos. A presença de ESBL foi identificada por Pesciaroli et al. (2020) em *E. coli* isoladas de aves de três sistemas de produção, porém com frequências mais baixas do que as observadas em nosso estudo (3,4%, 4,8% e 1,8%). Tal diferença pode estar relacionada à metodologia utilizada, que no caso do estudo citado não utilizou o enriquecimento não seletivo das amostras antes do isolamento seletivo. Corroborando com nossos resultados, a frequência reportada de *E. coli* produtora de ESBL e ESBL/AmpC isoladas de frangos a partir de suabe cloacal, no Líbano, foram de 27% e 21%, respectivamente mesmo sem a utilização do pré-enriquecimento (DANDACHI et al., 2018).

Escherichia coli produtora de ESBL foram reportadas em 18,6% dos isolados avaliados por Musa et al. (2020) quando da pesquisa em frangos de diferentes sistemas de produção.

Considerando a presença de ESBL em carcaças de frango, a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL no Brasil foi de 34% (BOTELHO et al., 2015). Das dez amostras de carne de frango analisadas por Alegría et al. (2020), utilizando metodologia de enriquecimento, duas amostras foram positivas para ESBL. Analisando amostras de frango (suabe cloacal) e de humanos (suabe retal), Doregiraee et al. (2018) identificaram 6,3% de *E. coli* produtoras de ESBL nas amostras de frangos, não tendo detectado cepas fenotipicamente compatíveis nas amostras de humanos.

Frequentemente, cepas produtoras de ESBL e AmpC apresentam resistência concomitante (corresistência) a outras classes de antimicrobianos, além das inerentes à produção dessas enzimas (COPPOLA et al., 2020; KOGA et al., 2015). Outra característica digna de nota é o fato de que muitas dessas enzimas são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons facilitando, assim, sua disseminação (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; BOTELHO et al., 2015; COPPOLA et al., 2020; LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

Para a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos das cepas confirmadas como ESBL foram avaliados 19 antimicrobianos pertencentes a doze categorias antibacterianas distintas. Além da cefotaxima para a qual a frequência foi de 100% de isolados resistentes (73/73) (conforme esperado, uma vez que este foi o antimicrobiano utilizado para a triagem das ESBL), os antimicrobianos para os quais essas cepas apresentaram maior frequência de resistência foram: ácido nalidíxico (68,5%, 50/73), ceftiofur (67,1%, n=49/73), cefepima (42,5%, n=31/73), sulfametoxazol + trimetoprim (41,1%, n=30/73) e tetraciclina (39,7%, 29/73). Todos os isolados foram suscetíveis à meropenem, amicacina, nitrofurantoína e colistina. Concordando com nossos resultados, maiores frequências de resistências aos betalactâmicos são reportadas em cepas produtoras de ESBL (ALEGRÍA et al., 2020; BOTELHO et al., 2015). Quanto à resistência aos não betalactâmicos, tetraciclina e quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) foram as principais resistências reportadas em ESBL isoladas de frango na Índia (HUSSAIN et al., 2019).

Apesar, de se tratarem de cepas selecionadas, os perfis de suscetibilidade das cepas ESBLs corroboraram, em parte, com os já observados nas cepas de *E. coli* genéricas, utilizadas como indicadores de resistência neste estudo. Da mesma forma, não foram observadas cepas resistentes à colistina e ao meropenem, indicando que tal resistência está ausente ou se encontra em níveis muito baixos que, mesmo após enriquecimento, não foram detectadas. Por outro lado,

quando analisada a frequência de MDR global, as cepas produtoras de ESBL apresentaram percentual bem superior (76,7%) em relação às cepas de *E. coli* não selecionadas (23,6%). Entre as cepas produtoras de ESBL não foi observada diferença significativa na frequência de cepas MDR entre os grupos, provavelmente devido à seleção realizada para seu isolamento.

Em consonância com nossos resultados, 78,5% de ESBL multirresistentes foram descritas por Hussain et al. (2019) quando da análise de *E. coli* isoladas de frangos de corte, frango caipira e de ExPEC de humanos. Frequência de ESBL-MDR ainda maior (98,5%) foi reportada em carne de frango na Coréia do Sul (PARK et al., 2019). Apesar de alguns estudos não caracterizarem as cepas como MDR, perfis de múltipla resistência a não betalactâmicos são relatados (ALEGRÍA et al., 2020; BOTELHO et al., 2015; DAY et al., 2019; MUSA et al., 2020). A resistência a quinolonas e aminoglicosídeos foram de 54,5% e 33,3%, respectivamente, em ESBL isoladas de carne de frango na Lituânia (KLIMIENĖ et al., 2018). Resistência adicional a cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, sufa/trimetoprima e fosfomicina foi observada por Botelho et al. (2015) quando da análise de carcaças de frango no Brasil.

A caracterização genotípica de cepas produtoras de ESBL não é tarefa simples, considerando a diversidade e quantidade de genes já descritos que podem estar relacionados a este tipo de resistência. Frequentemente, tal caracterização é voltada para a amplificação de genes específicos seguido de sequenciamento do gene para identificação de sua variante (BOTELHO et al., 2015; COPPOLA et al., 2020; LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016; PARK et al., 2019; SINGH; SINGHAL; VIRDI, 2018). Abordagens de sequenciamento de genoma completo podem ser uma ferramenta útil na busca mais rápida e precisa desses genes, auxiliando, ainda, na sua localização no genoma bacteriano a fim de determinar sua presença em elementos genéticos móveis, importantes no contexto epidemiológico. Ainda poucos estudos utilizam esta técnica (SEPP et al., 2019), provavelmente, devido ao custo ainda elevado e a necessidade de suporte computacional para a análise dos dados. Contudo, a partir do momento que esse tipo de dado é gerado, praticamente todas as perguntas que surgirem ao longo da pesquisa referente àquela cepa poderão ser respondidas sem a necessidade de um novo PCR, por exemplo. Sendo assim, neste estudo, 24 cepas de *E. coli* produtoras de ESBL (oito de cada grupo) tiveram seu genoma sequenciado. Das 24 cepas sequenciadas, apenas uma não retornou com qualidade suficiente para a realização das análises subsequentes, restando 23 genomas incluídos neste estudo.

A presença de genes de resistência foi acessada, inicialmente, pela busca automática pelo CARD, sendo identificados 95 genes de resistência, entre eles genes codificadores de enzimas ESBL e AmpC. A presença desses genes foi, então, confirmada pela busca manual no genoma montado e anotado de cada uma das cepas. Em uma cepa não foram identificados genes específicos codificadores de ESBL e/ou AmpC plasmidial. A ausência desses genes não invalida a importância do fenótipo de resistência, neste caso ESBL/AmpC, além da corresponsabilidade a oito antimicrobianos. A cepa também carregava três plasmídeos e diversos outros genes de resistência, como os responsáveis por expressão de bombas de efluxo, *ampH*, entre outros. O gene *ampH*, comum a todas as cepas sequenciadas neste estudo, está intimamente relacionado às beta-lactamases da Classe C de Ambler, porém não possui atividade de beta-lactamase. Contudo, AmpH se liga ao antimicrobiano betalactâmico reduzindo a quantidade de fármaco ativo na célula bacteriana, sugerindo uma possível explicação para o fenótipo de resistência (GONZÁLEZ-LEIZA; DE PEDRO; AYALA, 2011; HENDERSON et al., 1997). Outra possibilidade é o fato de todos os genes ESBL/AmpC não serem conhecidos ou nem todos estarem submetidos aos bancos de dados (SEPP et al., 2019). Quando da análise filogenética, a cepa em questão não demonstrou alta similaridade com os demais genomas do mesmo grupo filogenético. Sendo assim, outras abordagens de montagem e anotação do genoma desta cepa poderão ser realizadas futuramente a fim de confirmar a inexistência desses genes ESBL e entender melhor a relação do perfil genotípico e fenotípico da mesma.

Dentre os genes que conferem resistência aos betalactâmicos, foram identificados genes codificadores de enzimas do tipo pAmpC (*bla_{CMY-2}*) e ESBL (*bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{CTX-M-55}*, *bla_{SHV-2A}* e *bla_{TEM-141-1}*). A localização dos genes codificadores de AmpC e ESBLs em plasmídeos foi confirmada pela busca do gene no genoma bacteriano.

Beta-lactamases do tipo CTX-M representam o maior grupo de ESBLs e sua prevalência vem aumentando ao longo do tempo, estando disseminada globalmente, identificada em enterobactérias isoladas de diversas matrizes (BERENDES et al., 2020; DAY et al., 2019; FALGENHAUER et al., 2019; KPODA et al., 2018; LO; BARREIRA; GILIO, 2019; MUGHINI-GRAS et al., 2019). A transferência horizontal desses genes em plasmídeos conjugativos tem sido considerada fundamental para este cenário (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). No Brasil, um dos maiores produtores de carne de frango do mundo, a frequência de bactérias produtoras de ESBL tem sido relatada em diferentes etapas da cadeia avícola. Recentemente, Rabello e colaboradores (2020) revisando dados brasileiros sobre

resistência antimicrobiana em bactérias associadas a animais acessaram estudos com isolados de 2010 a 2016 nas regiões sul e sudeste do país. Esses estudos demonstraram a presença de genes codificadores de ESBL em amostras de animais (suabes cloacais), carne e carcaça de frangos. Nesta revisão, os autores relatam como mais frequentes nesse tipo de amostra as enzimas pertencentes às classes CTX-M, SHV, CMY e TEM, todas identificadas no nosso estudo em maior ou menor frequência.

Quanto à frequência desses genes em estudos realizados no Brasil, *bla*_{CTX-M-2} esteve presente em 88,2% de *E. coli* isoladas de porções de carne de frango e em 68,4% das isoladas de suabes cloacais no estudo realizado por Casella et al. (2018). Koga et al. (2015), analisando bacteriotecas de *E. coli* isoladas de frango nos anos de 2007 e 2013, observaram a presença de ESBLs somente nas bactérias isoladas em 2013. Nessas, a frequência de ESBL foi de 32,2% sendo a classe CTX-M a mais frequente, presente em 64,1% dessas cepas. Diferente dos estudos mencionados anteriormente, o gene *bla*_{CMY-2}, responsável pela expressão de pAmpC, foi o mais frequente em carcaças de frangos analisadas por Botelho et al. (2015) no ano de 2010.

Estudos em amostras clínicas de humanos demonstram as enzimas TEM e CTX como as frequentemente relacionadas a essas amostras. A enzima TEM foi mais frequente nos estudos realizados no Irã (83,3%) e no Egito (75%) (GHORBANI-DALINI et al., 2015; HASSUNA et al., 2020) enquanto CTX-M foi descrita com frequências de 40,1% na África (KPODA et al., 2018), 74,8% no Brasil (NOGUEIRA et al., 2015), 95,6% na Alemanha (GERHOLD et al., 2016) e 97% em Gana (FALGENHAUER et al., 2019). Dentre as suas variantes, os dados são bastantes diversos; são identificadas com frequência as variantes CTX-M-1 (GERHOLD et al., 2016; PEREIRA et al., 2019), CTX-M-2 (NOGUEIRA et al., 2015), CTX-M-14, CTX-M-15 (DORADO-GARCÍA et al., 2018; GERHOLD et al., 2016). Concordando com a hipótese de que muitos dos genes de resistência bacteriana são compartilhados entre bactérias isoladas de amostras de humanos e animais, observamos que o gene (*bla*_{CTX-M-2}) - mais frequente nas cepas de *E. coli* deste estudo - também tem sido identificado em amostras clínicas com frequência. O que não justifica, por si só, que estes têm sua origem em animais de produção. Neste sentido, um estudo realizado por Dorado-García et al. (2018) no qual o objetivo era quantificar as semelhanças moleculares de ESBL entre diferentes reservatórios, os autores verificaram que ESBL isoladas de humanos da comunidade são mais semelhantes às isoladas de humanos de hospitais, águas de superfície, esgoto e pássaros livres. Nestas amostras as principais enzimas identificadas foram CTX-M-1, 14 e 15.

O gene *bla*_{CTX-M-55} é frequentemente identificado em isolados de *E. coli* de diversas fontes na China. Contudo, em estudo realizado por Huang et al. (2020) o gene foi mais frequente em isolados de carne e de animais produtores de alimentos do que em isolados de humanos. CTX-M-8 foi descrita pela primeira vez no Brasil (BONNET et al., 2000). Desde então, tem sido descrita, esporadicamente, em enterobactérias de diferentes amostras e países (BOTELHO et al., 2015; DROPA et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; SAFARI et al., 2013). A exemplo de outras enzimas da classe, a detecção do gene *bla*_{CTX-M-8} associado a plasmídeos em amostras de carne de frango e isolados clínicos de humanos no Japão indica a capacidade de transferência horizontal desse gene e disseminação em diferentes hospedeiros (NORIZUKI et al., 2017).

O gene *ampC* plasmidial mais frequentemente relatado em enterobactérias, incluindo *E. coli*, é *bla*_{CMY-2} (DAME-KOREVAAR et al., 2017; PIETSCH et al., 2018). Em nosso estudo este gene esteve presente em 30,4% (7/23) das cepas analisadas. Das 23 cepas sequenciadas, seis foram caracterizadas fenotipicamente como ESBL/AmpC. Entretanto, duas dessas cepas não tiveram os genes codificadores de pAmpC (*bla*_{CMY-2}) identificados pela abordagem utilizada. Em uma delas, já mencionada anteriormente, nenhum gene plasmidial codificador de beta-lactamases foi detectado, e na outra cepa o gene *bla*_{CTX-M-8} foi identificado. Mais uma vez, especula-se que o fenótipo possa ser devido a outros mecanismos de resistência. Além disso, a presença do gene *bla*_{CMY-2} em três cepas com fenótipo negativo para AmpC pode estar relacionado a não expressão do gene nas condições *in vitro*, indicando, porém, a capacidade dessas cepas de expressarem tal característica em outros ambientes e circunstâncias.

Dentre as enzimas do tipo SHV, SHV-2 está entre as variantes de maior importância epidemiológica (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016). Em nosso estudo, apenas uma ESBL foi positiva para a presença deste gene. De modo geral, as cepas analisadas neste estudo confirmam a disseminação dos principais genes associados à produção de ESBL em *E. coli*. A presença desses genes carregados por plasmídeos e em produtos alimentícios retoma a importância do papel da cadeia de produção de alimentos na manutenção e disseminação de cepas resistentes, independente da origem desses genes.

Além de genes de resistência aos betalactâmicos, essas cepas carregam um arsenal de outros genes que podem conferir resistência a outros antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana. Entre estes, destacam-se a resistência aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas.

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos também é devido a expressão de enzimas, neste caso, as AMEs. Da mesma forma que nas ESBL, essas enzimas são frequentemente codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, facilitando sua disseminação entre os micro-organismos. A resistência em *E. coli* de origem humana e animal é frequentemente causada pelas enzimas AAC (3) - II / IV e AAC (6)-Ib as quais podem conferir resistência a diversos representantes da classe como, por exemplo, tobramicina, gentamicina, amicacina, canamicina, neomicina, entre outros (VAN DUIJKEREN et al., 2019; ZÁRATE et al., 2018). Das 23 cepas sequenciadas, todas apresentaram pelo menos um dos treze genes identificados neste estudo que conferem resistência aos aminoglicosídeos. A frequência desses genes pode estar relacionada ao uso de aminoglicosídeos na produção de frangos. A gentamicina, por exemplo, é utilizada em combinação com a vacina de Marek para injeção *in ovo* (VAN DUIJKEREN et al., 2019). O uso da gentamicina é difundido entre os produtores de frango em alguns países (ONYEANU; EZENDUKA; ANAGA, 2020). No Brasil, representantes da classe (espectinomicina, canamicina e neomicina) também têm seu uso regulamentado na terapêutica de aves (BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

Quanto às fluoroquinolonas, dentre os principais fatores relacionados à resistência a essa classe de antimicrobianos, destacam-se os genes *qnr* carreados por plasmídeos (PMQR). Contudo, outros mecanismos de resistência como a diminuição da atividade do fármaco pela presença de uma variante do aminoglicosídeo acetil transferase (*aac(6')-Ib-cr*) e bombas de efluxo (*QepA* e *OqxAB*), também são codificadas por genes carreados por plasmídeo (CORREIA et al., 2017; REDGRAVE et al., 2014; VAN HOEK et al., 2011).

O uso das quinolonas como aditivo zootécnico na produção de animais para a alimentação humana é proibido no Brasil desde 2009 - IN nº 26, 9/07/2009 (BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009). Por outro lado, representantes desta classe de antimicrobianos ainda são aprovados para o uso terapêutico em animais no Brasil, além de outros países como China, França e Espanha (ROTH et al., 2019a). Estudos têm identificado esses genes em plasmídeos de Enterobacteriaceae e *E. coli* isoladas de frangos (SEO; LEE, 2018). No Brasil, PMQR estiveram presentes em (23%) de bactérias isoladas de frangos, nesses plasmídeos foram identificados os genes *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* (FERREIRA et al., 2018).

Genes de resistência para quinolonas foram identificados em todas as cepas ESBL. Essa corresponsabilidade é frequentemente observada em cepas produtoras de ESBL (COPPOLA et al., 2020). Considerando a importância da transferência horizontal, verificamos a presença dos genes *qnrB19* e sua relação com plasmídeos. Seis cepas (26%) foram positivas para o gene *qnrB19* e estavam relacionadas a sequências genômicas de plasmídeos. Apesar da dificuldade de correlacionar a presença desses genes com os tipos de amostra, as frequências absolutas chamam atenção para o fato de que o gene *qnrB19* foi identificado em apenas uma cepa do grupo orgânico, enquanto nos grupos livre de antimicrobianos e convencional foram três e duas, respectivamente. De modo geral, o gene esteve presente nos três grupos de carcaças, independente da pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos.

Estudos epidemiológicos de micro-organismos importantes em saúde pública, como é o caso das ESBL, podem auxiliar no controle da disseminação dessas bactérias inferindo sua presença a partir de possíveis fontes e ações antrópicas. Neste sentido, a observação das correlações entre os grupos filogenéticos, os sorotipos e os nichos ecológicos podem ser de grande valia para a tomada de decisão na busca de alternativas para a redução do problema. Sendo assim, realizamos a análise filogenética dessas 23 cepas ESBL sequenciadas. Foi verificada grande diversidade tanto de STs (18) quanto de sorotipos (15), além da filogenética na qual foram identificados todos os sete filo-grupos entre as cepas. Tal diversidade dificulta a realização de correlações entre os grupos. Entretanto, essa diversidade pode ser considerada como benéfica uma vez que não foram evidenciados clones predominantes entre as amostras, supondo que a pressão de seleção, pelo menos neste aspecto, não está interferindo de forma significativa.

A dificuldade em relacionar os perfis dos isolados às origens (grupos) das carcaças foi mencionado em outros estudos. Em alguns desses, a marca de origem da carcaça parece ter uma relação mais próxima ao tipo de isolado quando comparados ao sistema de produção (DAVIS et al., 2018). Em nosso estudo, essa relação pôde ser observada na formação dos clusters quando visualizamos cepas com 100% de similaridade filogenética, ST e sorotipo (78C e 3B), provenientes de grupos distintos, porém de mesma marca. Entretanto, o contrário também foi verdadeiro no grupo convencional, quando observamos cepas similares filogeneticamente (23A e 13A – 14C e 15B), porém de marcas distintas. Uma limitação que encontramos neste estudo foi a impossibilidade de analisar as diferenças entre as marcas, uma vez que, como mencionado na metodologia, para alguns grupos de amostras só havia uma marca disponível no mercado.

A similaridade entre as cepas de uma mesma marca, independente do grupo, pode ser explicada pela natureza de toda a cadeia avícola, na qual os insumos da produção como matéria-prima das rações (exceto para produtos orgânicos) e os animais (pintinhos de um dia) podem ter a mesma origem. Além disso, por muitas vezes as plantas frigoríficas também são compartilhadas. Guardadas as limitações do estudo quanto ao número de marcas analisadas, podemos observar, verificando os filogrupos, algumas relações quanto às origens (grupos) das cepas ESBL analisadas. As cepas do GC ficaram concentradas em três filogrupos (D, E e F) sendo mais frequentes no grupo F, enquanto as cepas dos grupos GL e GO foram distribuídas em cinco filogrupos cada, demonstrando uma maior diversidade filogenética. Além disso, representantes dos grupos B2 e C foram classificadas apenas no grupo de produção GO.

Cepas relacionadas ao grupo B2 e D são, frequentemente, virulentas e relacionadas a infecções extraintestinais em humanos (KOHOUTOVA et al., 2014; LEE et al., 2010; SARALAYA et al., 2015; YILMAZ; ASLANTAŞ, 2020). No entanto, a relação entre hospedeiro e filogrupo é complexa e não é totalmente compreendida, podendo envolver outros fatores como clima, região e hábitos alimentares. Ainda assim, a existência de padrões associados ao hospedeiro pode auxiliar na identificação de cepas patogênicas potenciais (STOPPE et al., 2017).

Uma das hipóteses lançadas quando da estruturação deste estudo, e que pôde ser observada no caso dos filogrupos, é o fato de a diversidade microbiológica ser maior nos grupos nos quais não há pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos. Além de não haver pressão seletiva devido ao uso dos antimicrobianos, os animais alojados no sistema orgânico teriam, ainda, acesso a outros grupos filogenéticos de micro-organismos, devido à exposição ambiental.

Quanto aos sorotipos, esses geralmente estão associados à fonte das cepas e podem ser utilizados como marcadores epidemiológicos para a identificação de clones virulentos. Mais uma vez, com a identificação de 15 sorotipos distintos, não foi observada uma tendência de homogeneidade entre as cepas analisadas e os grupos. Além disso, os sorotipos mais frequentes foram compartilhados entre os grupos: H45 detectado nos três grupos e H4 detectado em GC e GO. O sorotipo H4 foi relacionado a *E. coli* enteropatogênica aviária (APEC) no Brasil (MONEZI BORZI et al., 2018) sendo o ST117 (representando duas dessas cepas) também identificado como marcador de APEC (CUMMINS et al., 2019; RONCO et al., 2017). O potencial zoonótico destas cepas tem sido investigado, uma vez que podem estar relacionadas a infecções extraintestinais em humanos (MANGES, 2016).

Cepas de *E. coli* ST131 são frequentemente associadas a isolados clínicos de humanos (DAY et al., 2019); todavia, alguns estudos sobre ESBL isoladas de animais indicam a sua capacidade de disseminação para outras espécies e ecossistemas (MANGES, 2016; SEENAMA; THAMLIKITKUL; RATTHAWONGJIRAKUL, 2019). Sugere-se, ainda, que a disseminação global do gene *bla*_{CTX-M} (o mais frequente nas cepas deste estudo) e o aumento da frequência de *E. coli* produtora de ESBL tenha sido, em grande parte, através da disseminação deste clone (PEIRANO; PITOUT, 2010). No presente estudo, identificamos uma cepa, procedente do grupo GO classificada como O25:H4-B2-ST131 CTX-M-55. Apesar deste clone estar, na maioria das vezes, relacionado ao gene *bla*_{CTX-M-15}, clones ST131 albergando a variante CTX-M-55 já foram descritas em suínos (SEENAMA; THAMLIKITKUL; RATTHAWONGJIRAKUL, 2019).

O ST648, identificado em duas cepas de GC (H:9-F-ST648-*bla*_{CTX-M}), tem emergido, apresentando padrões de virulência e multirresistência semelhantes aos da linhagem clonal ST131 (CAMPOS et al., 2018; SCHAUFLER et al., 2019). Seu potencial zoonótico é atribuído à adaptação ecológica entre hospedeiros e sítios de infecção. Apesar da previsão da sua frequência em bacteremia ainda ser menor que ST131, é considerado clinicamente competitivo devido à frequência de cepas multirresistentes estando em vias, segundo os autores, de se tornar outra linhagem clonal de alto risco de circulação global (SCHAUFLER et al., 2019).

Com a interação entre os ecossistemas (humano, animal e ambiente) e a plasticidade de Enterobacteriaceae como *E. coli*, dificilmente teremos certeza da origem destas cepas apenas pela classificação filogenética. Neste caso, independente da determinação da fonte, a simples detecção destes clones, mesmo em grupos de carcaças com uso restrito de antimicrobianos, serve de alerta para a importância do monitoramento destes micro-organismos, pois podem progredir na cadeia produtiva até a mesa do consumidor atuando como reservatório de genes de resistência e até mesmo, no caso de cepas virulentas, podendo causar doenças importantes.

Nesta linha, a determinação do impacto do uso de antimicrobianos na produção animal e saúde humana tem sido alvo de pesquisas a respeito das ações para a redução de populações bacterianas carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos. Frequentemente, sistemas de produção nos quais o uso dessas substâncias é restrito são utilizados para essas comparações (MILLMAN et al., 2013; MUCH et al., 2019; PESCIAROLI et al., 2020). Geralmente esses estudos, a exemplo do que realizamos na parte inicial da nossa pesquisa, utilizam micro-organismos indicadores. Porém, é de amplo conhecimento que estes micro-organismos

representam uma pequena porção da microbiota bacteriana em amostras complexas como fezes; tão ínfimo que por vezes não são detectados a nível de espécie em estudos de microbiota total. Além disso, genes de resistência importantes podem ser albergados também por bactérias ambientais ou bactérias não cultiváveis. Sendo assim, metodologias que utilizam a abordagem de metagenômica podem auxiliar nessas análises com dados mais abrangentes, apresentando um cenário mais factível quanto à população bacteriana, genes de resistência e virulência, presente nas amostras.

Em nosso estudo realizamos a abordagem de sequenciamento *shotgun*. Um dos primeiros desafios enfrentados foi a aquisição de um DNA de excelente qualidade que fosse capaz de, após sequenciado, refletir a microbiota bacteriana presente nas carcaças de frango. Para tanto, e por se tratar de uma amostra cuja carga bacteriana era relativamente baixa, além da presença de “contaminantes” (células do hospedeiro), foi necessária a padronização da extração do DNA total (dados não apresentados) até que se chegasse ao protocolo descrito neste estudo e que foi considerado adequado para a obtenção dos resultados discutidos a seguir.

Mesmo lançando mão do tratamento do DNA para a redução de células do hospedeiro, após o sequenciamento ainda foram verificadas sequências compatíveis com a espécie (*Gallus gallus* - galGal4). Talvez esta seja uma das limitações da técnica de sequenciamento para o tipo de amostra analisada quando comparada a abordagem do 16S. Contudo, tal limitação foi superada quando do alinhamento do genoma hospedeiro e “subtração” dessas sequências para a realização das análises do microbioma e metarresistoma, propriamente dito.

As análises do metarresistoma demonstraram maior frequência de resistência para betalactâmicos e aminoglicosídeos, não refletindo com precisão os resultados obtidos quando observada a resistência apenas do indicador *E. coli* para o qual a maior frequência verificada foi frente à tetraciclina. Já a partir desta análise podemos observar que o indicador *E. coli* pode não refletir a resistência aos antimicrobianos carregada pela população bacteriana. Contudo, o uso do indicador *E. coli* não pode ser invalidado, uma vez que sua utilização pretende predizer pressões seletivas impostas pelo uso de antimicrobianos em animais para alimentação, sendo sentinela para a resistência a antimicrobianos com atividade em bactérias Gram negativas (NYIRABAHIZI et al., 2020).

A resistência aos betalactâmicos esteve representada por uma variedade de genes, porém, nenhum deles relacionados à produção de beta-lactamases de espectro estendido em *E. coli* o que, mais uma vez, corroborando com nossas análises fenotípicas, demonstra a baixa

frequência dessas bactérias nas amostras analisadas. Em contrapartida, os genes codificadores de oxacilinasas, frequentemente reportados em *Pseudomonas aeruginosa* foram identificados em todos os grupos.

Os três grupos amostrados apresentaram alta diversidade de genes de resistência. Todavia, quando verificada a abundância desses genes, o grupo convencional apresentou maior abundância quando comparado aos grupos livre de antimicrobianos e orgânico. A princípio, esta diferença não parece estar relacionada ao número de bactérias, uma vez que GC apresentou menor número de *reads* bacterianas (1,48M) em relação aos grupos GL (2,23M) e GO (5,22M), não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos de amostras. Sugere-se, portanto, um maior número de genes de resistência por micro-organismos em GC, o que seria compatível com a diferença também superior de *E. coli* multirresistente.

A determinação do corerresistoma pretende inferir a população de genes de resistência a antimicrobianos comum aos três grupos, que não seriam dependentes, neste caso, da pressão de seleção pelo uso dos antimicrobianos. Os genes comuns a todos os grupos conferiam resistência às principais classes identificadas como betalactâmicos e aminoglicosídeos. Quando verificados os genes exclusivos de cada grupo, com poucas exceções, os genes também refletiram as principais resistências demonstradas pela totalidade dos genes.

A transferência horizontal de genes de resistência tem sido uma das principais formas da disseminação da resistência bacteriana entre e intra espécies. Neste sentido, plasmídeos e transposons podem servir de veículos para tal transferência. Porém, a lista de elementos genéticos móveis que atuam nesses processos conta ainda com integrases e transposases (CHENG et al., 2019). A exemplo da abundância de genes de resistência, o grupo convencional apresentou maior abundância de elementos genéticos móveis quando comparado ao grupo orgânico. Entre os elementos genéticos móveis comuns a todos os grupos, plasmídeos IncFIB e IncFII foram identificados. Esses plasmídeos também estiveram presentes nas amostras de ESBL sequenciadas em nosso estudo e são, frequentemente, relacionados à presença de fatores de virulência em *E. coli*, *Salmonella* e *Klebsiella* (KHAJANCHI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020; ZHANG et al., 2019). Além disso, IncF esteve presente em mais de 90% dos 880 isolados ST131 caracterizados por Kondratyeva; Salmon-Divon e Navon-Venezia (2020) demonstrando a importância deste elemento.

A presença de genes de resistência está diretamente relacionada ao tipo de micro-organismo (microbiota) presente na amostra/hospedeiro. Sendo assim, espera-se que o

metarresistoma seja alterado conforme ocorre a modulação da microbiota bacteriana. Dados de literatura indicam a modulação da microbiota de animais conforme o uso de antimicrobianos e outras ações antrópicas (AE KIM et al., 2017; COSTA et al., 2017; MUNK et al., 2018). Contudo, a modulação das populações bacterianas em relação aos diferentes grupos de amostras a nível de filo, classe ou família não ficou evidente nas amostras analisadas neste estudo.

No presente estudo, a caracterização da microbiota bacteriana das amostras esteve representada por 38 filós e 72 classes. Não houve diferença entre os grupos e a abundância dos principais filós e classes identificadas. O principal filo identificado foi Proteobacteria, enquanto Gammaproteobacteria representou 90% das classes identificadas nos três grupos de amostras.

Diferenças discretas, em relação à alternância de posição, foram observadas entre os grupos na classificação das famílias. Pseudomonadaceae, Moraxellaceae e Enterobacteriaceae se mantiveram como as três principais famílias identificadas nos grupos GL e GO, representando 87,5% e 71,2% do total de famílias identificadas nos dois grupos, respectivamente. Enquanto em GC as três principais famílias identificadas foram Moraxellaceae (39,1%), Pseudomonadaceae (33,8%) e Enterobacteriaceae (17,4%); essas três famílias representaram 90,3% do total de famílias identificadas neste grupo de produção. Por outro lado, foi observada diferença estatística significativa entre os grupos referente à abundância a nível de gênero. Essa diferença está relacionada, provavelmente, ao número de *reads* bacterianas sequenciadas em cada grupo de amostras a qual, em números absolutos, foi maior nos grupos GL e GO.

Concordando com nossos resultados, Proteobacteria foi o filo mais frequente em amostras de carcaças de frangos coletadas de diferentes pontos da indústria (chegada, pré-chiller e pós-chiller) (HANDLEY et al., 2018). Da mesma forma, avaliando os efeitos da temperatura de estocagem na diversidade bacteriana em pele de frango, Meng et al. (2019) observaram a predominância de Proteobacteria, independente da temperatura de estocagem. Embora este estudo não tenha avaliado temperaturas de congelamento (condizente com nossas amostras), ele indica a predominância da microbiota da pele de frangos após o abate semelhante ao observado nas amostras congeladas avaliadas nesta pesquisa. Além disso, em consonância com nossos resultados quanto à abundância relativa de gênero, segundo Oakley et al. (2013), *Pseudomonas* foi o principal gênero reportado em produtos de frangos no varejo.

A comunidade bacteriana na carne de frango pode variar de acordo com a origem dos animais, alimentação, processamento/manipulação, tipo de embalagem, temperatura de

armazenamento, entre outros (ROUGER; TRESSE; ZAGOREC, 2017). Quanto às principais famílias identificadas neste estudo, Pseudomonadacea e Moraxellacea estão associadas à presença de micro-organismos deteriorantes em alimentos, a exemplo de espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (FORSYTHE, 2013; LI et al., 2020). Esses micro-organismos desempenham um importante papel na indústria de alimentos relacionado a perdas econômicas (QUINTIERI; FANELLI; CAPUTO, 2019). Entretanto, algumas espécies são consideradas patógenos oportunistas importantes frequentemente relatados em infecções nosocomiais (CHNG et al., 2020). Além disso, atrelada à diversidade de genes de resistência a antimicrobianos observada neste estudo estes micro-organismos podem ser potenciais reservatórios desses genes. Neste sentido, identificamos e caracterizamos *Pseudomonas otitidis* (K_25 NZ_WTFN00000000) em uma das carcaças, o primeiro relato da espécie se deu em 2006 recuperada em infecção do conduto auditivo de humanos (CLARK et al., 2006). A cepa é relacionada à produção de metalo-betalactamase que confere resistência a carbapenênicos, penicilinas e cefalosporinas (THALLER et al., 2011). Concordando com o estudo anterior, a cepa identificada em nosso estudo apresentou fenótipo de suscetibilidade reduzida a meropenem atrelada, provavelmente, à presença do gene *bla_{POM-1}* (VIEIRA et al., 2020) já descrito na espécie.

Apesar da abordagem de sequenciamento por metagenômica ser considerada menos sensível quando comparada aos métodos fenotípicos que se utilizam de meios seletivos de enriquecimento para isolamento e detecção de bactérias de crescimento rápido (HENDRIKSEN et al., 2019; MUNK et al., 2018), a baixa frequência relativa de identificação de *E. coli* nos três grupos retoma o que foi observado na enumeração do micro-organismo e na pesquisa de ESBL. Além de demonstrar um panorama geral da população bacteriana, genes de resistência e elementos genéticos móveis, os resultados obtidos com a metagenômica auxiliaram no entendimento dos padrões observados durante os cultivos em laboratório, os quais chamaram atenção pela presença de cepas não fermentadoras de lactose (dados não apresentados) durante o processo de seleção das ESBL e a enumeração de *E. coli* comensal.

Ainda restam muitas questões a serem respondidas quanto o uso de antimicrobianos na produção animal e o aumento e disseminação de cepas resistentes. Nosso estudo demonstrou que a pressão de seleção pode, sim, influenciar a ocorrência de cepas resistentes quando observamos o aumento de cepas multirresistentes no grupo no qual não há restrição do uso de antimicrobianos. Da mesma forma, indica que ocorre o aumento de cepas totalmente suscetíveis

quando não há este tipo de seleção. Mesmo que em baixa frequência na população, cepas de *E. coli* produtoras de ESBL e pAmpC foram igualmente identificadas em todos os grupos, inclusive representadas por clones sabidamente virulentos como ST131 e ST648. Quando o metarresistoma foi acessado, genes de resistência e elementos móveis relevantes foram identificados em todos os grupos, apesar de serem mais abundantes em frangos do grupo convencional. Ao contrário, o perfil e abundância da microbiota foi similar, indicando que no grupo convencional poderia haver uma concentração de marcadores de resistência em alguns grupos bacterianos, corroborando com a multirresistência detectada no indicador *E. coli*. De forma global, os grupos convencional e livre de antimicrobianos apresentaram perfis fenotípicos e genotípicos com maior similaridade, provavelmente porque estes sistemas compartilham boa parte da cadeia produtiva, tendo como diferencial apenas o uso ou restrição de antimicrobianos.

A apreciação dos resultados do presente estudo corrobora com a complexidade do tema resistência a antimicrobianos e com a necessidade de adotar abordagem “One Health” envolvendo não só compartimentos animais e humanos, mas também o ambiente. A presença ou ausência de genes de resistência em frangos congelados ofertados ao consumidor parece não depender da origem da produção. Provavelmente esses genes circulam ou são mantidos em bactérias presentes no ambiente interno e externo da granja e são levados ao contato com os animais de diversas formas. Entretanto, a frequência de MDR e Tsus, além da diferença na abundância de genes de resistência detectada pela metagenômica, sinaliza que a organização do sistema de produção orgânico possivelmente contribui para uma menor pressão de seleção no sentido da resistência a antimicrobianos.

7 CONCLUSÃO

Frangos congelados com selo de produção orgânica e livre de antibióticos apresentam perfis de genes de resistência, microbiota, presença de *E. coli* produtora de ESBL e prevalência de resistência fenotípica a antimicrobianos semelhantes ao encontrado em frangos de criação convencional. Entretanto, frangos com selo de produção orgânica apresentam maior prevalência de *E. coli* genérica totalmente suscetível a antimicrobianos importantes para humanos, menor prevalência de cepas multirresistentes e menor frequência de cepas resistentes à ampicilina e ácido nalidíxico do que frangos de produção convencional. De forma similar, a abundância de genes de resistência presentes em frangos congelados de produção orgânica é menor do que a encontrada em frangos de produção convencional. Essas observações indicam que há menor pressão de seleção de resistência a antimicrobianos nos sistemas de produção orgânica e que esse fato tem reflexo no produto ofertado ao consumidor.

REFERÊNCIAS

- ABDELGADER, Sheikheldin A. et al. Antibiotics Resistance Genes Screening and Comparative Genomics Analysis of Commensal *Escherichia coli* Isolated from Poultry Farms between China and Sudan. **BioMed Research International**, New York, v. 2018, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/5327450/>>. Acesso em: 25 mar. 2019.
- ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual. **Relatório Anual da ABPA 2020**, São Paulo, p. 160, 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- ABRAHAM, Sam et al. *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from Australian meat chickens remain susceptible to critically important antimicrobial agents. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 10, p. e0224281, 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0224281>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- AE KIM, Sun et al. Assessment of Chicken Carcass Microbiome Responses during Processing in the Presence of Commercial Antimicrobials Using a Next Generation Sequencing Approach. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 43354, p. 14, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28230180>>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- AGUNOS, Agnes et al. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. e0179384, 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179384>>. Acesso em: 20 mar. 2019.
- AGYARE, Christian et al. Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. In: **Antimicrobial Resistance - A Global Threat**. London: IntechOpen, 2018.
- ALEGRÍA, Ángel et al. Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 17, n. 1312, p. 9, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085569/>>. Acesso em: 3 jan. 2021.
- ALVES, Ruthie. **Aminoglycosides: Pharmacology, Clinical Uses and Health Effects**. Hauppauge, Nova York: Nova Science Publishers, 2016.
- AMIN, Mohammed Badrul et al. Occurrence and genetic characteristics of *mcr-1*-positive colistin-resistant *E. coli* from poultry environments in Bangladesh. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 22, p. 546–552, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344122/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- BAJAJ, Priyanka; SINGH, Nambram S.; VIRDI, Jugsharan S. *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 417, p. 18, 2016. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 23 abr. 2019.
- BANKEVICH, Anton et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, New York, v. 19, n. 5, p. 455–

77, 2012. Disponível em: <<http://bioinf.spbau.ru/spades>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BARAN, Alper; ADIGÜZEL, Mehmet Cemal; YÜKSEL, Mehmet. Prevalence of antibiotic-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in chicken meat from Eastern Turkey. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 40, n. 3, p. 355–359, 2020.

BARON, Sandrine et al. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 9, p. 5428–5434, 2014. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BERENDES, David et al. Human faeces-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* discharge into sanitation systems in 2015 and 2030: a global and regional analysis. **The Lancet Planetary Health**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. e246–e255, 2020. Disponível em: <www.thelancet.com/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

BEVAN, Edward R.; JONES, Annie M.; HAWKEY, Peter M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/72/8/2145/3852658>>. Acesso em: 7 dez. 2020.

BIRADAR, C. S. et al. Organic poultry farming in india- issues and approaches. **Veterinary World**, Rajkot (Gujarat), v. 4, n. 6, p. 273–277, 2011. Disponível em: <www.veterinaryworld.org>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BITRUS, Asinamai; CHUANCHUEN, Rungtip; LUANGTONGKUM, Taradon. Emergence of colistin resistance in extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae isolated from food animals and its public health implication: A review. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, Mymensingh, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.5455/javar.2018.e246>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

BLAAK, Hetty et al. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0135402, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4536194/pdf/pone.0135402.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. Disponível em: <<http://www.usadellab.org/cms/index>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10858358/>>. Acesso em: 9 jan. 2021.

BORDA-MOLINA, Daniel; SEIFERT, Jana; CAMARINHA-SILVA, Amélia. Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Gothenburg, Sweden, v. 16, p. 131–139, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.03.002>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

BORTOLAIA, Valeria; BISGAARD, Magne; BOJESEN, Anders Miki. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3–4, p. 379–386, 2010. Disponível em: <https://ac-els-cdn.ez45.periodicos.capes.gov.br/S0378113509005446/1-s2.0-S0378113509005446-main.pdf?_tid=2ec72983-6255-4294-9727-5f5bdec29702&acdnat=1551900588_7a5d40520359fb0ac1c4895ae798ee90>. Acesso em: 6 mar. 2019.

BOTELHO, Larissa Alvarenga Batista et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 2, p. 249–254, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000200249&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 nov. 2020.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Instrução Normativa Nº 1, de 13 de janeiro de 2020. Proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana, na forma desta Instrução Normativa. Brasil, 2020. p. 6. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/autenticidade.html>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 26, de 10 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de antimicrobianos de uso veterinário. Brasília, DF, Brasil, 2009. p. 9. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>. Acesso em: 7 mar. 2019.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 46, de 6 de outubro de 2011. Estabelecer o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção, na forma desta Instrução Normativa e de seus Anexos I a VIII. Brasília, DF, 2011. p. 167.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 18, de 20 de junho de 2014. Instituir o selo único oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, e estabelecer os requisitos para a sua utilização, na forma desta Instrução Normativa e de seus Anexos I a IV. Brasília, DF, Brasília, DF, 2014a. p. 561–565.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 17, de 18 de junho de 2014. Alterar os arts. da Instrução Normativa no 46, de 6 de outubro de 2011. Brasília, DF, Brasília, DF, 2014b. p. 561–565.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 45, de 22 de novembro DE 2016. Proibir, em todo o território

nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259>. Acesso em: 1 maio. 2019.

BRASIL: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria N° 171, de 13 de dezembro de 2018. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. Brasília, DF, 2018. p. 23.

BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instrução Normativa N° 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA), quando aplicável, para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, em conformidade com o disposto na Resolução RDC n° 328, de 19 de dezembro de 2019, que dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. Brasil, 2019a. p. 98. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>>

BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA. Instrução Normativa N° 60, de 23 de Dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasil, 2019b. p. 16.

BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC N° 331, de 23 de dezembro 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Brasil, 2019c. p. 96. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272%0Ahttp://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>

BRASIL: PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. LEI N° 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília, DF, 2003. p. 8. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>

BREITWIESER, Florian P.; SALZBERG, Steven L. Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. **Bioinformatics**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 1303–1304, 2020.

BROOKS, S. P. J. et al. In-feed administered sub-therapeutic chlortetracycline alters community composition and structure but not the abundance of community resistance determinants in the fecal flora of the rat. **Anaerobe**, London, v. 15, n. 4, p. 145–154, 2009. Disponível em: <<http://www.ccac.ca>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019. Disponível em: <www.nature.com/nrmicro>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CAMPOS, Ana Carolina C. et al. Comprehensive Molecular Characterization of *Escherichia*

coli Isolates from Urine Samples of Hospitalized Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 243, p. 12, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00243/full>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

CASELLA, Tiago et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 73, n. 12, p. 3293–3297, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30184138/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

CASTANON, J. I. R. Review History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 2466–2471, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article-abstract/86/11/2466/1573697>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

CASTELLANOS, Luis Ricardo et al. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncI1 plasmids in the Colombian poultry chain. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5268450/pdf/pone.0170777.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CHANDRA, Bhushan et al. **Antibiotic Resistance in Poultry Environment**. New Delhi: Centre for Science an Environment, 2017. Disponível em: <<http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/ABR-report.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

CHAPMAN, H. D. A landmark contribution to poultry science-Prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 813–815, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.3382/ps.2008-00316>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

CHENG, Guyue et al. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, London, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0623-2>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

CHNG, Kern Rei et al. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. **Nature Medicine**, London, v. 26, n. 6, p. 941–951, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0894-4>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

CHUKWUDI, Chinwe U. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 8, p. 4433–4441, 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

CLARK, Linda L. et al. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 4, p. 709–714, 2006.

CLERMONT, Olivier et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited:

Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, N.J., v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 12 ago. 2018.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. Disponível em: <<http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED30:2020&scope=user>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

COHEN STUART, James et al. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 212–214, 2012.

COPPOLA, Nadia et al. Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in Escherichia coli Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 7, n. 588919, p. 7, 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7717973/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC7717973/?report=abstract)>. Acesso em: 4 jan. 2021.

CORREIA, Susana et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017. Disponível em: <www.microbiologyresearch.org>. Acesso em: 25 abr. 2019.

COSTA, Marcio C. et al. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 2, 2017. Disponível em: <<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC5319738&blobtype=pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

COSTA, Sergio. **A saga da Avicultura Brasileira: como o Brasil se tornou o maior exportador de carne de frango**. Rio de Janeiro: São Paulo UBABEF, 2011. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/fcc1856de5f036bb47a8a246a0781e26.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

CRANDALL, P. G. et al. Organic poultry: Consumer perceptions, opportunities, and regulatory issues. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 18, n. 4, p. 795–802, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/japr/article-abstract/18/4/795/752766>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

CUMMINS, Max L. et al. Whole genome sequence analysis of Australian avian pathogenic Escherichia coli that carry the class 1 integrase gene. **Microbial Genomics**, London, v. 5, n. 2, p. 13, 2019. Disponível em: <<http://www.genomicepidemiology.com>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

CUPERUS, Tryntsje et al. Protective effect of in ovo treatment with the chicken cathelicidin analog D-CATH-2 against avian pathogenic E. coli. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 26622, p. 11, 2016. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 27 abr. 2019.

D’COSTA, Vanessa M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, London, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature10388>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

DAME-KOREVAAR, Anita et al. Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 203, p. 211–214, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.024>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

DAME-KOREVAAR, Anita et al. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 162, p. 136–150, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587718304720>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

DANDACHI, Iman et al. Prevalence and Characterization of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated From Lebanese Poultry: A Nationwide Study. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 550, p. 16, 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 17 maio. 2019.

DANGOUR, Alan D. et al. Nutrition-related health effects of organic foods: A systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bathesda, v. 92, n. 1, p. 203–210, 2010. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cababstracts>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

DAVIS, Gregg S. et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. **BMC Microbiology**, London, v. 18, n. 174, p. 7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1322-5>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

DAY, Michaela J. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, NY, v. 19, n. 12, p. 1325–1335, 2019. Disponível em: <www.thelancet.com/infection>. Acesso em: 10 nov. 2020.

DEMATTE FILHO, Luiz Carlos; PEREIRA, Gustavo do Valle. O mercado de frangos e ovos orgânicos e caipira - Potencial de mercado. In: XXI SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA - PECNORDESTE 2017, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza

DENG, Wenwen et al. Antibiotic Resistance in *Salmonella* from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 24, n. 6, p. 782–791, 2018.

DEPOORTER, P. et al. Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 30–38, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.026>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

DIAS, M. R. et al. Self-monitoring microbiological criteria for the assessment of hygienic procedures during chicken slaughtering. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 317–324, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0381>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

DIAZ-SANCHEZ, S. et al. Antibiotic Use in Poultry: A Driving Force for Organic Poultry Production. **Food Protection Trends**, Des Moines, v. 35, n. 6, p. 440–447, 2015. Disponível em: <<https://www.foodprotection.org/publications/food-protection-trends/archive/2015-11-antibiotic-use-in-poultry-a-driving-force-for-organic-poultry-production/>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

DORADO-GARCÍA, Alejandro et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 73, n. 2, p. 339–347, 2018.

DOREGIRAE, Fatemeh et al. Changes in antimicrobial resistance patterns and dominance of extended spectrum β -lactamase genes among faecal *Escherichia coli* isolates from broilers and workers during two rearing periods. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 17, n. 3, p. 815–824, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjas20>>. Acesso em: 2 jan. 2021.

DROPA, Milena et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 23, n. 5, p. 4953–4958, 2016.

DUNAI, Anett et al. Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion. **eLife**, Cambridge, UK, v. 8, p. e47088, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.47088.001>>

DUNN, John R.; GIMENO, Isabel M. Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. **Avian Diseases**, Ithaca, N. Y., v. 57, n. 2 SUPPL. 1, p. 483–490, 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap>. Acesso em: 16 dez. 2020.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control; EFSA, European Food Safety Authority; EMA, Committee for Medicinal Products for Veterinary use. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. **European Food Safety Authority**, Parma, v. 15, n. 10, p. 70, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.5017>>

EFSA, European Food Safety Authority. Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. **European Food Safety Authority**, Parma, v. 17, n. 6, p. 122, 2019.

ELUMBA, Zeus Seligbon; ALLERA, Ma. Lean Minerales; TAGANAS, Resmae Rose Ragmac. Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Retail Chicken Meat at Selected Markets in Valencia City, Bukidnon, Philippines. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, Kerala, v. 7, n. 2, p. 53–58, 2018. Disponível em: <www.ajbls.com>. Acesso em: 23 mar. 2019.

EUCAST: EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance**, 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY; EUROPEAN SURVEILLANCE OF VETERINARY ANTIMICROBIAL CONSUMPTION. **Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016. (EMA/275982/2018)**. Amsterdam. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2016-trends-2010-2016-eighth-esvac_en.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY; EUROPEAN SURVEILLANCE OF VETERINARY ANTIMICROBIAL CONSUMPTION. **Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. (EMA/24309/2020)**. Amsterdam. Disponível em: <<https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials->>. Acesso em: 27 nov. 2020.

FALGENHAUER, Linda et al. Detection and characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* from humans and poultry in Ghana. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 3358, p. 8, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03358/full>>. Acesso em: 8 jan. 2021.

FERNANDES, Sueli Aparecida et al. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, NY, v. 23, n. 5, p. 580–589, 2017.

FERREIRA, Joseane Cristina et al. Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae isolated from healthy poultry in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 60, p. 66–70, 2018. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/meegid>. Acesso em: 30 abr. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. **2017 Summary Report - Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals** Department of Health e Human Services - USA. Maryland. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM628538.pdf>>. Acesso em: 8 mar. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. **2018 Summary Report - Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals** Department of Health e Human Services - USA. Maryland. Disponível em: <<https://www.fda.gov/industry/animal-drug-user-fee-act-adufa/questions-and-answers-summary-report-antimicrobials-sold-or-distributed-use-food-producing-animals>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

FORMAN, Joel; SILVERSTEIN, Janet. Organic Foods: Health and Environmental Advantages and Disadvantages. **American Academy of Pediatrics**, Springfield, v. 130, n. 5, p. e1406–e1415, 2012. Disponível em: <www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-2579>. Acesso em: 19 fev. 2019.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre.

GALGANO, Fernanda et al. Conventional and organic foods: A comparison focused on

animal products. **Cogent Food & Agriculture**, Abingdon, v. 96, p. 1142818, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1142818>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; LABBY, Kristin J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. **MedChemComm**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 11–27, 2016.

GERBER, P.; OPIO, C.; STEINFELD, H. Poultry production and the environment - a review. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO**, Rome, p. 1–27, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/home/events/bangkok2007/docs/part2/2_2.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2019.

GERHOLD, G. et al. Multilocus sequence typing and CTX-M characterization of ESBL-producing E. Coli: A prospective single-centre study in Lower Saxony, Germany. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 144, n. 15, p. 3300–3304, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0950268816001412>>. Acesso em: 9 jan. 2021.

GHORBANI-DALINI, Sadegh et al. Molecular epidemiology of ESBLs genes and multi-drug resistance in diarrheagenic Escherichia Coli strains isolated from adults in Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 14, n. 4, p. 1257–1262, 2015.

GILLINGS, Michael R.; PAULSEN, Ian T.; TETU, Sasha G. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1388, n. 1, p. 92–107, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27768822>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

GONZÁLEZ-LEIZA, Silvia M.; DE PEDRO, Miguel A.; AYALA, Juan A. Amph, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 193, n. 24, p. 6887–6894, 2011. Disponível em: <<http://jb.asm.org/>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

GOVERNMENT OF CANADA, Public Health Agency of Canada. **Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2018: Integrated Findings**. 2020. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports/2018-annual-report-integrated-findings.html>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

GROSSMAN, Trudy H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, Woodbury, NY, v. 6, n. a025387, p. 25, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989065>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

GUENTHER, Sebastian et al. Environmental emission of multiresistant Escherichia coli carrying the colistin resistance gene mcr-1 from German swine farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 72, n. 5, p. 1289–1292, 2017. Disponível em: <www.reset-verbund.de>. Acesso em: 25 abr. 2019.

GYLES, Carlton L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Ames.

HANDLEY, John A. et al. Microbiome Profiles of Commercial Broilers Through Evisceration and Immersion Chilling During Poultry Slaughter and the Identification of Potential Indicator Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 345, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00345/full>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

HASMAN, Henrik et al. **Laboratory Protocol Isolation of ESBL-, AmpC-and carbapenemase-producing E. coli from fresh meat**. Copenhagen. Disponível em: <https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/397_esbl-ampc-cpeprotocol-version-meat-v6-16-02-18.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2019.

HASSUNA, Noha A. et al. Molecular characterization of Extended-spectrum β lactamase-producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59772-z>>

HEGDE, Narasimha V; KARIYAWASAM, Subhashinie; DEBROY, Chitrita. Comparison of antimicrobial resistant genes in chicken gut microbiome grown on organic and conventional diet. **Veterinary and Animal Science**, New York, v. 1–2, p. 9–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vas.2016.07.001>>. Acesso em: 8 mar. 2019.

HENDERSON, Thomas A. et al. AmpC and AmpH, proteins related to the class C β -lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 179, n. 19, p. 6112–6121, 1997.

HENDRIKSEN, Rene S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, London, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.

HOFACRE, C.; FRICKE, J.; INGLIS, T. Antimicrobial use in poultry. In: GRIGUERE, S.; PRESCOTT, J.; DOWLING, P. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. Fifth ed. Ames: Wiley Blackwell, 2013. p. 569–588.

HOSOI, Y. et al. Sales of veterinary antimicrobial agents for therapeutic use in food-producing animal species in Japan between 2005 and 2010. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 33, n. 3, p. 1007–1015, 2014.

HOSURU SUBRAMANYA, Supram et al. Detection and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae from the gut of healthy chickens, *Gallus gallus domesticus* in rural Nepal: Dominance of CTX-M-15-non-ST131 *Escherichia coli* clones. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 5, p. e0227725, 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0227725>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

HU, Yoon Sung et al. Prevalence and Mechanism of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Swine Feces in Korea. **Journal of Food Protection**, Amsterdam, v. 80, n. 7, p. 1145–1151, 2017. Disponível em: <<https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X.JFP-16-502>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

HUANG, Ying et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **The Lancet**

Infectious Diseases, New York, NY, v. 20, n. 4, p. 404–405, 2020. Disponível em: <www.thelancet.com/infection>. Acesso em: 9 jan. 2021.

HUSSAIN, Arif et al. Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2120, p. 13, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02120/full>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

HUSSAIN, Arif et al. Genomic and Functional Characterization of Poultry *Escherichia coli* From India Revealed Diverse Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Lineages With Shared Virulence Profiles. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 2766, p. 12, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02766/full>>. Acesso em: 3 jan. 2021.

HUYGHEBAERT, Gerard; DUCATELLE, Richard; IMMERSEEL, Filip Van. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 2, p. 182–188, 2011. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

IRRGANG, Alexandra et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 7, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ISLAM, Salequl et al. High abundance of the colistin resistance gene *mcr-1* in chicken gut-bacteria in Bangladesh. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74402-4>>

JACOBY, George A. AmpC-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

JAGADEESAN, Balamurugan et al. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food Microbiology**, London, v. 79, p. 96–115, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

JAHANTIGH, Mohammad et al. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. **BMC Veterinary Research**, London, v. 16, n. 1, p. 1–6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02488-z>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

JAJA, Ishmael Festus et al. Prevalence and distribution of antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates obtained from meat in South Africa. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 5, p. e0216914, 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0216914>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

JIMÉNEZ-BELENGUER, Ana et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. **Avian Pathology**, Houghton, v. 45, n. 4, p. 501–507, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cavp20>>. Acesso em:

23 mar. 2019.

KAAS, Rolf S. et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, 2014. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4128722/?report=abstract](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171111)>. Acesso em: 17 dez. 2020.

KARAVOLIAS, Joanna et al. Raised without antibiotics: Impact on animal welfare and implications for food policy. **Translational Animal Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 337–348, 2018.

KHAJANCHI, Bijay K. et al. Comparative genomic analysis and characterization of incompatibility group FIB plasmid encoded virulence factors of *Salmonella enterica* isolated from food sources. **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 570, p. 14, 2017. Disponível em: <<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3954-5>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

KIMERA, Zuhura I. et al. Antimicrobial use and resistance in food-producing animals and the environment: An African perspective. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, London, v. 9, n. 37, p. 12, 2020. Disponível em: <<https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-0697-x>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

KIRCHHELLE, Claas. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, London, v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>>

KLIMIENÉ, Irena et al. Evaluation of genotypical antimicrobial resistance in ESBL producing *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from retail poultry meat. **Journal of Food Safety**, Westport, Conn., v. 38, n. e12370, p. 7, 2018.

KOGA, Vanessa L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, NY, v. 12, n. 6, p. 479–485, 2015.

KOHOUTOVA, Darina et al. *Escherichia coli* strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, n. 733, p. 8, 2014. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-014-0733-7>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

KONDRATYEVA, Kira; SALMON-DIVON, Mali; NAVON-VENEZIA, Shiri. Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 36, p. 11, 2020.

KORB, Arnildo et al. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 258–264, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n3/0100-736X-pvb-35-03-00258.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

KPODA, Dissinviel S. et al. Distribution of resistance genes encoding ESBLs in Enterobacteriaceae isolated from biological samples in health centers in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Research Notes**, London, v. 11, n. 1, p. 5–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3581-5>>

KRAUSE, Kevin M. et al. Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, NY, v. 6, n. 6, p. 19, 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4888811/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)>. Acesso em: 27 nov. 2020.

KURITZA, Leandro Nagae; WESTPHAL, Patrick; SANTIN, Elizabeth. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1457–1465, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20120220>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

KURNIA, Ryan Septa et al. Molecular detection of genes encoding resistance to tetracycline and determination of plasmid-mediated resistance to quinolones in avian pathogenic Escherichia coli in sukabumi, Indonesia. **Veterinary World**, Rajkot (Gujarat), v. 11, n. 11, p. 1581–1586, 2018. Disponível em: <www.veterinaryworld.org/Vol.11/November-2018/9.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2019.

LAIRON, Denis. Nutritional quality and safety of organic food. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, London, v. 30, n. 1, p. 33–41, 2010. Disponível em: <www.agronomy-journal.org>. Acesso em: 28 mar. 2019.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, London, v. 205, p. 21–27, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.016>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012. Disponível em: <<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>>. Acesso em: 22 dez. 2020.

LEE, Seungok et al. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of escherichia coli and their association with blaCTX-M. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 361–367, 2010. Disponível em: <www.annclinlabsci.org>. Acesso em: 19 dez. 2020.

LI, Hui et al. Control of pathogenic and spoilage bacteria in meat and meat products by high pressure: Challenges and future perspectives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 19, n. 6, p. 3476–3500, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12617>>. Acesso em: 9 jan. 2021.

LIAKOPOULOS, Apostolos; MEVIUS, Dik; CECCARELLI, Daniela. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: Neglected yet ubiquitous. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 1374, p. 27, 2016. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies>>. Acesso em: 7 dez. 2020.

LIMA, Tiago et al. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Salmonella enterica: A Review. **Microorganisms**, Basel, v. 7, n. 2, p. 55, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-2607/7/2/55>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

LIRA, Felipe et al. Metagenomic analysis of an urban resistome before and after wastewater treatment. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

LIU, Yi Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)>

LIU, Yiyun; LIU, Jian-Hua. Monitoring Colistin Resistance in Food Animals, An Urgent Threat. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 16, n. 6, p. 443–446, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14787210.2018.1481749>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

LO, Denise Swei; BARREIRA, Eliane Roseli; GILIO, Alfredo Elias. A Brazilian survey of the antimicrobial susceptibility of 847 Escherichia coli isolates from community-acquired urinary tract infections. **Urology & Nephrology Open Access Journal**, Hilversum, v. 7, n. 4, p. 81–83, 2019.

MA, Feiyang et al. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, Amsterdam, p. 7, 2020.

MACIUCA, Iuliana E. et al. Genetic Features of mcr-1 Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing Escherichia coli From Romanian Poultry. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 2267, p. 15, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111113/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>>. Acesso em: 8 nov. 2020.

MANGES, A. R. Escherichia coli and urinary tract infections: The role of poultry-meat. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 22, n. 2, p. 122–129, 2016.

MANYI-LOH, Christy et al. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 795, p. 48, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29601469>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

MARON, Dina Fine; SMITH, Tyler Js; NACHMAN, Keeve E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, London, v. 9, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.globalizationandhealth.com/content/9/1/48>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

MARSHALL, Bonnie M.; LEVY, Stuart B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical microbiology reviews**, Washington, DC, v. 24, n. 4, p. 718–33, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976606>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

MAZUTTI, Kelly et al. Effect of colistin and tylosin used as feed additives on the

performance, diarrhea incidence, and immune response of nursery pigs. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 1947–1962, 2016.

MEDEIROS, Patrícia Tomazini et al. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, 2009. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/viewFile/2175-7925.2009v22n3p157/17927>>. Acesso em: 7 mar. 2019.

MENG, J. et al. Effect of storage temperature on bacterial diversity in chicken skin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 126, n. 3, p. 854–863, 2019.

MIE, Axel et al. Human health implications of organic food and organic agriculture: A comprehensive review. **Environmental Health**, London, v. 16, n. 111, p. 22, 2017. Disponível em: <<https://ehjournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12940-017-0315-4>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

MILLMAN, Jack M. et al. Prevalence of antibiotic-resistant E. coli in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. **F1000Research**, London, v. 2, n. 155, p. 13, 2013. Disponível em: <<http://f1000research.com/articles/2-155/v2>>. Acesso em: 29 maio. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Informe 2018**. Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2019.

MIRANDA, J. M. et al. Evolution of Resistance in Poultry Intestinal Escherichia coli During Three Commonly Used Antimicrobial Therapeutic Treatments in Poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, p. 1643–1648, 2008. a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article-abstract/87/8/1643/1539961>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

MIRANDA, J. M. et al. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 4, p. 412–416, 2008. b. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0956713507001041/1-s2.0-S0956713507001041-main.pdf?_tid=0097b3a1-cd29-4133-ba28-db333c2406d1&acdnat=1527529963_303c9e4eae0400f6333a59757c6843f>. Acesso em: 28 maio. 2018.

MOAWAD, Amira A. et al. Occurrence of Salmonella enterica and Escherichia coli in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. **Gut Pathogens**, London, v. 9, n. 57, p. 13, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

MONEZI BORZI, Mariana et al. Characterization of avian pathogenic Escherichia coli isolated from free-range helmeted guineafowl. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 107–112, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.011>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

MONTE, Daniel Farias et al. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 5, p. e02718-16, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193665>>. Acesso em: 29 maio. 2018.

MORE, Simon J. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 73, n. 2, p. 12, 2020. Disponível em: <<https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13620-019-0154-4>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

MPUNDU, Prudence et al. Evaluation of bacterial contamination in dressed chickens in Lusaka abattoirs. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 7, n. FEB, p. 19, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2019.00019/full>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

MUCH, Peter et al. Differences in antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* isolated from caecal contents of organically and conventionally raised broilers in Austria, 2010–2014 and 2016. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 171, p. 104755, 2019.

MUGHINI-GRAS, Lapo et al. Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing β -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. **The Lancet Planetary Health**, Amsterdam, v. 3, n. 8, p. e357–e369, 2019. Disponível em: <www.thelancet.com/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 4, n. 2, p. 119–127, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/pdf/nihms715987.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MUNK, Patrick et al. Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. **Nature Microbiology**, London, v. 3, n. 8, p. 898–908, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/194647>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

MUSA, Laura et al. Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* and ESBL-Producing *Escherichia coli* Diffusion in Conventional, Organic and Antibiotic-Free Meat Chickens at Slaughter. **Animals**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 7, p. 1215, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/7/1215>>. Acesso em: 3 jan. 2021.

NAYME, K. et al. Occurrence of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Escherichia coli* isolates from chicken meat. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 60, n. 6, p. 798–801, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cbps20>>. Acesso em: 7 nov. 2020.

NGUYEN, Nhung T. et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 82, n. 13, p. 3727–3735, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih->

gov.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC4907207/pdf/zam3727.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2019.

NOGUEIRA, Keite da Silva et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 48, n. 2, p. 162–169, 2015. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 8 jan. 2021.

NORIZUKI, Chihiro et al. Specific blaCTX-M-8/IncI1 Plasmid Transfer among Genetically Diverse Escherichia coli Isolates between Humans and Chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 6, p. 1–7, 2017.

NYIRABAHIZI, Epiphanie et al. Evaluation of Escherichia coli as an indicator for antimicrobial resistance in Salmonella recovered from the same food or animal ceca samples. **Food Control**, Guildford, v. 115, p. 107280, 2020.

OAKLEY, Brian B. et al. The Poultry-Associated Microbiome: Network Analysis and Farm-to-Fork Characterizations. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 8, n. 2, p. e57190, 2013. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3584146/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3584146/?report=abstract)>. Acesso em: 6 jan. 2021.

OECD. 2020. Disponível em: <<https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>>. Acesso em: 23 out. 2020.

OGUTTUA, J. W.; VEARYA, C. M.; PICARD, J. A. Antimicrobial drug resistance of Escherichia coli isolated from poultry abattoir workers at risk and broilers on antimicrobials. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 79, n. 4, p. 161–166, 2008. Disponível em: <<https://jsava.co.za/index.php/jsava/article/view/266/249>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

OKORAFOR, Obianuju Nkiruka et al. Multidrug-resistant enterobacteria colonize commercial day-old broiler chicks in Nigeria. **Veterinary World**, Rajkot (Gujarat), v. 12, p. 418–423, 2019. Disponível em: <www.veterinaryworld.org/Vol.12/March-2019/11.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 643, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00643/abstract>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

OLIVEIRA, Érica Maria De et al. High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae with bla KPC and bla NDM from patients at a public hospital in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 53, p. e20200397, 2020. Disponível em: <www.scielo.br/rsbmt/www.rsbmt.org.br>. Acesso em: 20 dez. 2020.

ONYEANU, Chika Thankgod; EZENDUKA, Vivienne; ANAGA, Aruh Ottah. Determination of gentamicin use in poultry farms in Enugu state, Nigeria, and detection of its residue in slaughter commercial broilers. **International Journal of One Health**, Morbi, v. 6, 2020. Disponível em: <www.doi.org/10.14202/IJOH.2020.6-11>. Acesso em: 27 nov. 2020.

ORBOI, Manuela Dora; BANES, A.; PAUNCHICI, Lamina. Aspects regarding the organic food market in several European countries. **Scientific papers animal science and biotechnologies**, Timisoara, v. 41, n. 1, p. 6, 2008. Disponível em: <<http://spasb.ro/index.php/spasb/article/view/1265>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

OSMAN, Kamelia M. et al. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 5859, p. 14, 2018. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports/>. Acesso em: 19 mar. 2019.

PALZKILL, Timothy. Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Lausanne, v. 5, n. 16, p. 19, 2018.

PAMVET-PR. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango- PAMvet**, 2005. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia_sanitaria/Relatorio_levantamento_frango.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2019.

PARK, Hyeun et al. Predominance of bla CTX-M-65 and bla CTX-M-55 in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from raw retail chicken in South Korea. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 17, p. 216–220, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.005>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

PÄRNÄNEN, Katariina et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistance and mobile genetic elements. **Nature Communications**, London, v. 9, n. 3891, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06393-w>>

PEACOCK, Sharon J.; PATERSON, Gavin K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, CA, v. 84, n. 1, p. 577–601, 2015. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

PEIRANO, Gisele; PITOUT, Johann D. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, p. 316–321, 2010.

PEREIRA, Juliano Lacava et al. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates from urinary tract infections in southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, N.Y., v. 25, n. 2, p. 173–181, 2019. Disponível em: <www.liebertpub.com>. Acesso em: 8 jan. 2021.

PERRIN-GUYOMARD, Agnès et al. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 21, n. 6, p. 1–3, 2016. Disponível em: <www.eurosurveillance.org/Rapidcommunications/Prevalenceofmcr-1incommensalEscherichiacolifrom>. Acesso em: 25 abr. 2019.

PESCIAROLI, Michele et al. Antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* are less frequently isolated from poultry raised using non-conventional management systems than from conventional broiler. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 314, n. March 2019, p. 108391, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108391>>

PHIRI, Nelson et al. Antibiotic-resistant *Salmonella* species and *Escherichia coli* in broiler chickens from farms, abattoirs and open markets in selected districts of Zambia. **Journal of Epidemiological Research**, Hawthorne, CA, v. 6, n. 1, p. 13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.04.20.050914>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

PIETSCH, Michael et al. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. **BMC Genomics**, London, v. 19, n. 1, p. 601, 2018. Disponível em: <<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4976-3>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

POIREL, Laurent et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, Washington, DC, p. 289–316, 2018. Disponível em: <<http://doc.rero.ch>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

PRICE, Lance B. et al. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, N. C., v. 115, n. 12, p. 1738–1742, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

PROJAHN, Michaela et al. Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing- *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses. **Food Microbiology**, London, v. 77, p. 185–191, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.010>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

QUINN, J. P. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2. ed. Iowa: John Wiley and Sons, 2011.

QUINTIERI, Laura; FANELLI, Francesca; CAPUTO, Leonardo. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. **Foods**, Basel, v. 8, n. 9, p. pii: E372, 2019.

RABELLO, Renata F. et al. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, Basel, v. 10, n. 552, p. 43, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32224900/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

RAMOS, Lidiana de Siqueira Nunes. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. 2009. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009. Disponível em: <http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/Tese_LSNR.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2019.

REDGRAVE, Liam S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 22, p. 438–445, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

REIS, Matheus de Paula et al. Níveis da bacitracina de zinco como melhorador do desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1093–1099, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v44n6/a16014cr2012-0099.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

RONCO, Troels et al. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78: H4 in Nordic broiler production. **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 13, p. 8, 2017.

ROSSA, Luciane Silvia et al. Resistência antimicrobiana e ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo Introdução Material e Métodos Delineamento do estudo. **Biotemas**, Florianópolis, v. 26, n. 3, p. 211–220, 2013.

ROSSA, Luciane Silvia; STERTZ, Sônia Cachoeira; MACEDO, Renata Ernlund Freitas De. Regulamentação, mercado e qualidade da carne de frango orgânico no Brasil – Revisão. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Prado Velho, v. 10, n. 1, p. 29–44, 2012.

ROTH, Nataliya et al. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. **Poultry Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, 2019. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey539>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

ROTH, Nataliya et al. Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in broilers challenged with a multi-resistant *E. coli* strain and received ampicillin, an organic acid-based feed additive or a synbiotic preparation. **Poultry Science**, Champaign, v. 98, n. 6, p. 2598–2607, 2019. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez004>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

ROUGER, Amélie; TRESSE, Odile; ZAGOREC, Monique. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. **Microorganisms**, Basel, v. 5, n. 50, p. 16, 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5620641/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35620641/)>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SAFARI, Mojde et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamase among clinical isolates of enterobacteriaceae in Markazi Province, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Avaz, v. 6, n. 8, p. 1–6, 2013.

SANCHEZ, Helen M. et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from conventional, no antibiotics, and humane family owned retail broiler chicken meat. **Animals**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 12, p. 2217, 2020.

SARALAYA, V. et al. Characterization of *Escherichia coli* phylogenetic groups associated with extraintestinal infections in South Indian population. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, Enugu, v. 5, n. 4, p. 241, 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4512115/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/281115/)>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SCHAUFLER, Katharina et al. Genomic and functional analysis of emerging virulent and multidrug-resistant *Escherichia coli* lineage sequence type 648. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, Washington, v. 63, n. 6, p. 12, 2019. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

SCHULZ, Jochen et al. Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 5117, p. 1–7, 2019. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 2 nov. 2020.

SEENAMA, Chakkraphong; THAMLIKITKUL, Visanu; RATTAWONGJIRAKUL, Panan. Multilocus sequence typing and blaESBL characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand. **Infection and Drug Resistance**, Auckland, N.Z., v. 12, p. 2201–2214, 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.2147/IDR.S209545>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SEKYERE, Osoi J. et al. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 121, p. 601–617, 2016.

SEO, Kwang Won; LEE, Young Ju. Prevalence and Characterization of β -Lactamases Genes and Class 1 Integrons in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Chicken Meat in Korea. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, NY, v. 24, n. 10, p. 1599–1606, 2018. Disponível em: <www.liebertpub.com>. Acesso em: 30 abr. 2019.

SEPP, Epp et al. Phenotypic and Molecular Epidemiology of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 2465, p. 10, 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6882919/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6882919/?report=abstract)>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SILVA, Neusely Da et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SIMONEIT, C. et al. Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken – A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 118, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.11.010>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

SINGH, Nambram S.; SINGHAL, Neelja; VIRDI, Jugsharan S. Genetic environment of blaTEM-1, blaCTX-M-15, blaCMY-42 and characterization of integrons of *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.

SOMDA, Namwin S. et al. Safety of ready-to-eat chicken in Burkina Faso: microbiological quality, antibiotic resistance, and virulence genes in *Escherichia coli* isolated from chicken samples of Ouagadougou. **Food Science and Nutrition**, Malden, MA, v. 6, n. 4, p. 1077–1084, 2018. Disponível em: <www.foodscience-nutrition.com>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SOUFI, Leila et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 497–502, 2010. Disponível em: <<https://ac-els-cdn.ez45.periodicos.capes.gov.br/S0168160510006215/1-s2.0-S0168160510006215->

main.pdf?_tid=11f1214b-7b9f-43dc-ae1b-012bef47d765&acdnat=1552755548_a942cd52d522d8f43d792786d9cf7fc3>. Acesso em: 16 mar. 2019.

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIAC, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Marha. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro.

ŚREDNICKA-TOBER, Dominika et al. Composition differences between organic and conventional meat: a systematic literature review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 115, p. 994–1011, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838835/pdf/S0007114515005073a.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

SRINIVAS, Pavithra; RIVARD, Kaitlyn. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia, v. 19, n. 11, 2017. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs11908-017-0596-3.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

STOPPE, Nancy de Castro et al. Worldwide phylogenetic group patterns of Escherichia coli from commensal human and wastewater treatment plant isolates. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2512, p. 20, 2017.

TANG, Karen L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, Amsterdam, v. 1, n. 8, p. e316–e327, 2017. Disponível em: <www.thelancet.com/>. Acesso em: 17 mar. 2019.

TANG, Karen L. et al. Comparison of different approaches to antibiotic restriction in food-producing animals: stratified results from a systematic review and meta-analysis. **BMJ Global Health**, London, v. 4, n. 4, p. 1710, 2019. Disponível em: <<http://www.>>

THALLER, Maria Cristina et al. Metallo- β -lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: A species-related trait. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 1, p. 118–123, 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

THORSØE, Martin Hvarregaard; CHRISTENSEN, Tove; POVLSEN, Karen Klitgaard. Organics are good, but we don't know exactly what the term means!" trust and knowledge in organic consumption. **Food, Culture and Society**, London, v. 19, n. 4, p. 681–704, 2016.

TRUNG, Nguyen Vinh et al. Zoonotic transmission of mcr-1 colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, GA, v. 23, n. 3, p. 529–532, 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5382726/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC5382726/?report=abstract)>. Acesso em: 28 nov. 2020.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI#Guidance for Industry #213**. Rockville. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndus>

try/d>. Acesso em: 22 abr. 2019.

UR RAHMAN, Sadeeq et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, New York, v. 2018, n. 9519718, p. 14, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5892270/?report=abstract>. Acesso em: 6 jan. 2021.

UR RAHMAN, Sadeeq; AHMAD, Shakoor; KHAN, Imad. Incidence of ESBL-producing-Escherichia coli in poultry farm environment and retail poultry meat. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 39, n. 1, p. 116–120, 2019.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet. Infectious diseases**, Amsterdam, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022435>. Acesso em: 5 mar. 2019.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503141112>. Acesso em: 5 mar. 2019.

VAN DEN BOGAARD, Anthony E.; STOBBERINGH, Ellen E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327–335, 2000. Disponível em: <www.ischemo.org>. Acesso em: 6 mar. 2019.

VAN DER HORST, Michael A. et al. Effects of Therapeutical and Reduced Levels of Antibiotics on the Fraction of Antibiotic-Resistant Strains of Escherichia coli in the Chicken Gut. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 1, p. 55–61, 2013. Disponível em: <www.liebertpub.com>. Acesso em: 19 mar. 2019.

VAN DUIJKEREN, Engeline et al. The use of aminoglycosides in animals within the EU: Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: A review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 74, n. 9, p. 2480–2496, 2019.

VAN GOMPEL, Liese et al. Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. **Environment International**, [s. l.], v. 143, n. 105939, p. 13, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32679392/>. Acesso em: 20 dez. 2020.

VAN HOEK, Angela H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, n. SEP, p. 27, 2011. Disponível em: <www.nih.gov/niid/16s_database/index.html.>. Acesso em: 23 abr. 2019.

VAN HOEK, Angela H. A. M. et al. Longitudinal study of ESBL Escherichia coli carriage on an organic broiler farm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 73, n. 12, p. 3298–3304, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/73/12/3298/5096848>. Acesso em: 23 abr. 2019.

VAN LOO, Ellen et al. Effect of Organic Poultry Purchase Frequency on Consumer Attitudes

Toward Organic Poultry Meat. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 7, p. S384–S397, 2010.

VANDERHAEGHEN, Wannes; DEWULF, Jeroen. Antimicrobial use and resistance in animals and human beings. **The Lancet Planetary Health**, Ames, v. 1, n. 8, p. e307–e308, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2542519617301420?via%3Dihub>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

VARGA, Csaba et al. Antimicrobial resistance in fecal Escherichia coli and Salmonella enterica isolates: A two-year prospective study of small poultry flocks in Ontario, Canada. **BMC Veterinary Research**, London, v. 15, n. 464, p. 10, 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6925488/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6925488/?report=abstract)>. Acesso em: 6 jan. 2021.

VASCONCELOS, Priscylla C. et al. Draft genome sequence of mcr-1-mediated colistin-resistant Escherichia coli ST359 from chicken carcasses in Northeastern Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 23, p. 135–136, 2020.

VIEIRA, Tatiana Regina et al. In-depth genomic characterization of a meropenem-nonsusceptible pseudomonas otitidis strain contaminating chicken carcass. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 48, n. 1743, p. 6, 2020. Disponível em: <<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

VIKRAM, Amit et al. Impact of “raised without antibiotics” beef cattle production practices on occurrences of antimicrobial resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83, n. 22, 2017. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

VON TIPPELSKIRCH, Philine et al. Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 281, p. 82–89, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.022>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

VUTHY, Yith et al. Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among Escherichia coli and among Salmonella subsp. in chicken food chains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 7, n. 7, p. 670–674, 2017.

WALES, Andrew D.; DAVIES, Robert H. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. **Antibiotics**, Basel, v. 4, n. 4, p. 567–604, 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4790313/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC4790313/?report=abstract)>. Acesso em: 20 nov. 2020.

WANG, Ruobing et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. **Nature Communications**, London, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <www.nature.com/naturecommunications>. Acesso em: 25 abr. 2019.

WANG, Y. et al. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in Escherichia coli of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, NY, v. 20,

p. 1161–71, 2020. Disponível em: <<http://125.124.115.227:8088/sy/>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

WONG, S. S.; AINI, M. S. Factors influencing purchase intention of organic meat among consumers in Klang Valley, Malaysia. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 24, n. 2, p. 767–778, 2017. Disponível em: <[http://www.ifrj.upm.edu.my/24 \(02\) 2017/\(43\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(02)2017/(43).pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2019.

WONGSUVAN, Gumphol et al. Antibiotic use in poultry: A survey of eight farms in Thailand. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 96, n. 2, p. 94–100, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29403112>>. Acesso em: 7 mar. 2019.

WOOD, Derrick E.; LU, Jennifer; LANGMEAD, Ben. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome Biology**, London, v. 20, n. 1, p. 257, 2019. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-019-1891-0>>. Acesso em: 8 nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponível em: <www.paprika-annecy.com>. Acesso em: 30 dez. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th Revision**. Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://www.oalib.com/references/1801489%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision**. Geneva: World Health Organization, 2019.

XIE, Biao et al. Consumer perceptions and attitudes of organic food products in eastern China. **British Food Journal**, Surrey, v. 117, n. 3, p. 1105–1121, 2015. Disponível em: <www.emeraldinsight.com/0007-070X.htm>. Acesso em: 29 mar. 2019.

XIONG, Wenguang; SUN, Yongxue; ZENG, Zhenling. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 25, n. 19, p. 18377–18384, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>>. Acesso em: 8 mar. 2019.

YASSIN, Afrah Kamal et al. Identification and characterization of mcr mediated colistin resistance in extraintestinal Escherichia coli from poultry and livestock in China. **Federation European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 364, n. 24, p. 6, 2017. Disponível em: <<http://orcid.org/0000-0001-7874-8340>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

YILMAZ, Ebru Şebnem; ASLANTAŞ, Özkan. Phylogenetic group/subgroups distributions, virulence factors, and antimicrobial susceptibility of escherichia coli strains from urinary tract infections in hatay. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro,

v. 53, n. e20190429, p. 6, 2020.

YULISTIANI, R. et al. Prevalence of antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains from chicken meat at traditional markets in Surabaya, Indonesia. In: IOP CONF. SERIES: MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING 2017, Surakarta. **Anais...** Surakarta: IOP Publishing Ltd, 2017. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/193/1/012007/pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

ZÁRATE, Sandra G. et al. Overcoming aminoglycoside enzymatic resistance: Design of novel antibiotics and inhibitors. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 284, p. 18, 2018. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/molecules>

ZEN, Sergio De et al. **Evolução da avicultura no Brasil Mercado internacional**INFORMATIVO CEPEA. São Paulo. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 25 fev. 2019.

ZHANG, Jilei et al. Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1, mcr-2 and mcr-3) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports/>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ZHANG, Pei et al. Characterization of Five Escherichia coli Isolates Co-expressing ESBL and MCR-1 Resistance Mechanisms From Different Origins in China. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 1994, p. 9, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01994/full>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

ZHOU, Yang et al. Antibiotic Administration Routes and Oral Exposure to Antibiotic Resistant Bacteria as Key Drivers for Gut Microbiota Disruption and Resistome in Poultry. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, n. 1319, p. 15, 2020. Disponível em: <www.frontiersin.org>

ZIBANDEH, Soodabeh et al. Investigation of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolates from broiler chickens during a rearing period in Iran. **Veterinarski arhiv**, Zagreb, v. 86, n. 4, p. 565–572, 2016. Disponível em: <<http://vetarhiv.vef.unizg.hr/papers/2016-86-4-8.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

ANEXO I

Mecanismos de resistência às tetraciclinas caracterizados pelos genes *tet* e *otr*

| Bomba de efluxo (36) | Proteção ribossomal (13) | Proteção enzimática (13) | Função desconhecida |
|--|---|---|----------------------------|
| <i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(59)</i> | <i>tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(32),</i> | <i>tet(X)</i> | <i>tet(U)</i> |
| <i>tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y)</i> | <i>tet(Q), tet(T), tet(36), tet(61)</i> | <i>tet(37)</i> | |
| <i>tet(Z), tet(30), tet(31), tet(33), tet(57)</i> | <i>otr(A), tetB(P)b, tet</i> | <i>tet(34)</i> | |
| <i>tet(35)</i> | <i>tet(44)</i> | <i>tet(47) j, tet(48)j, tet(49)j, tet(50)</i> | |
| <i>tet(39), tet(41)</i> | | <i>tet(51) j,tet(52)j, tet(53)j, tet(54)</i> | |
| <i>tet(K), tet(L), tet(38), tet(45)e, tet(58)</i> | | <i>tet(55) j, tet(56)</i> | |
| <i>tetA(P), tet(40)</i> | | | |
| <i>otr(B), otr(C)</i> | | | |
| <i>tcr3</i> | | | |
| <i>tet(42)</i> | Proteção ribossomal mosaico (11) | | |
| <i>tet(43)</i> | <i>tet(O/32/O, tet(O/W/32/O), tet(O/32/O</i> | | |
| <i>tetAB(46)</i> | <i>tet(O/W/32/O/W/O), tet(W/32/O), tet(O/W)</i> | | |
| <i>tetAB(60)</i> | <i>tet(W/32/O/W/O), tet(O/W/O), tet(O/W/32/O)</i> | | |
| <i>tet(62)</i> | <i>tet(S/M), tet(W/N/W)</i> | | |
| <i>tet(64)</i> | | | |

Adaptada de <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf> acesso em 09 de novembro de 2020.

APÊNDICE A

Lista das 33 amostras analisadas no estudo piloto, com sua origem, descrição e enumeração de coliformes totais (CT) e *E. coli*.

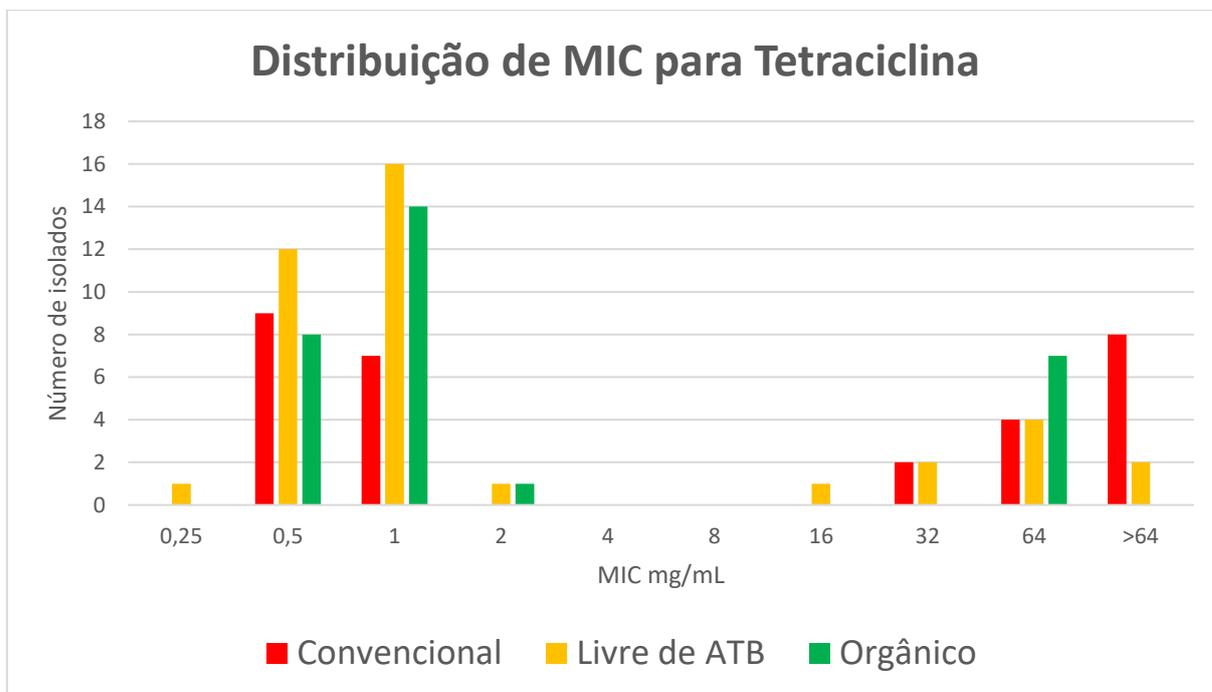
| ID_lab | Grupo | Descrição | Estado | CT | <i>E. coli</i> | CT/g | <i>E. coli/g</i> |
|---------------|--------------|---------------------|---------------|-----------|-----------------------|-------------|-------------------------|
| 1 | Convencional | Frango Inteiro CP | MT | 13 | 8 | 2 | 1 |
| 2 | Convencional | Frango Congelado CP | GO | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3 | Convencional | Frango Inteiro CP | RS | 97 | 15 | 18 | 3 |
| 4 | Convencional | Frango Congelado CP | SC | 68 | 50 | 14 | 10 |
| 5 | Convencional | Frango Inteiro CP | GO | 37 | 20 | 8 | 4 |
| 6 | Convencional | Frango Congelado CP | SC | 28 | 21 | 7 | 6 |
| 7 | Convencional | Frango Congelado CP | GO | 35 | 9 | 7 | 2 |
| 8 | Convencional | Frango Congelado CP | SC | 17 | 15 | 3 | 3 |
| 9 | Convencional | Frango Inteiro CP | MT | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 10 | Convencional | Frango Congelado CP | GO | 65 | 33 | 14 | 7 |
| 11 | Livre de ATB | Frango SP | SP | 74 | 31 | 17 | 7 |
| 12 | Livre de ATB | Frango Inteiro SP | SP | 78 | 9 | 16 | 2 |
| 13 | Livre de ATB | Frango Inteiro | SP | 128 | 42 | 26 | 9 |
| 14 | Livre de ATB | Frango Inteiro SP | SP | 124 | 37 | 26 | 8 |
| 15 | Livre de ATB | Frango Inteiro SP | SP | 72 | 9 | 20 | 2 |
| 17 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 290 | 20 | 68 | 5 |
| 19 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 980 | 30 | 231 | 7 |
| 21 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 60 | 40 | 20 | 13 |
| 22 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 50 | 0 | 12 | 0 |
| 23 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 70 | 10 | 19 | 3 |
| 24 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 70 | 0 | 23 | 0 |
| 25 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 206 | 25 | 37 | 5 |
| 27 | Livre de ATB | Frango Congelado CP | SP | 80 | 0 | 26 | 0 |
| 16 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 610 | 50 | 163 | 13 |
| 18 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 70 | 10 | 18 | 3 |
| 26 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 730 | 130 | 225 | 40 |
| 28 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 20 | 0 | 6 | 0 |
| 29 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 130 | 90 | 37 | 25 |
| 30 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 260 | 180 | 64 | 44 |
| 31 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 150 | 30 | 29 | 6 |
| 32 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 100 | 0 | 31 | 0 |
| 33 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 60 | 0 | 13 | 0 |
| 34 | Orgânico | Frango Congelado CP | SP | 80 | 20 | 29 | 7 |

Distribuição da contagem de *E. coli* por grama de carne de frango em cada grupo analisado.

| Grupo | Média | Mediana | Moda | Mínimo | Máximo |
|--------------------------|--------------|----------------|-------------|---------------|---------------|
| Convencional | 4 | 3 | 3 | 0 | 10 |
| Livre de antimicrobianos | 4,7 | 5 | 0 | 0 | 13 |
| Orgânico | 13,8 | 6,5 | 0 | 0 | 44 |

APÊNDICE B

Distribuição da concentração inibitória mínima (MIC – sigla em inglês) dos isolados de *E. coli* analisados no estudo piloto frente à tetraciclina.

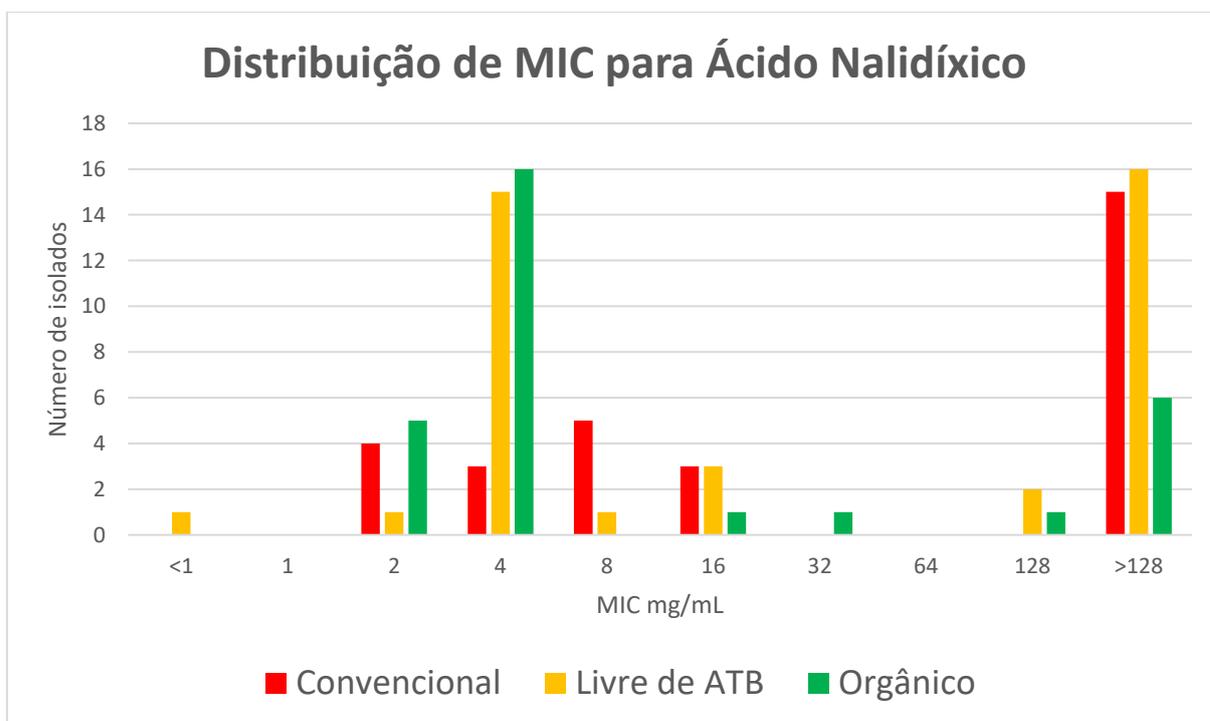


| Grupo | MIC mg/mL | | | | | | | | | | Total de isolados | Resistentes (%) |
|--------------|-----------|-----|----|---|---|----|----|----|----|-----|-------------------|-----------------|
| | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8* | 16 | 32 | 64 | >64 | | |
| Convencional | 0 | 9 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 8 | 30 | 47% |
| Livre de ATB | 1 | 12 | 16 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 2 | 39 | 23% |
| Orgânico | 0 | 8 | 14 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 30 | 24% |

* ECOFF (mg/mL) > 8; Breakpoint (mg/L) \geq 4

APÊNDICE C

Distribuição da concentração inibitória mínima (MIC – sigla em inglês) dos isolados de *E. coli* analisados no estudo piloto frente ao antimicrobiano ácido nalidíxico.



| Grupo | MIC mg/mL | | | | | | | | | | Total de isolados | Resistentes (%) |
|--------------|-----------|---|---|----|---|----|-----|----|-----|------|-------------------|-----------------|
| | <1 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32* | 64 | 128 | >128 | | |
| Convencional | 0 | 0 | 4 | 3 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 15 | 30 | 50% |
| Livre de ATB | 1 | 0 | 1 | 15 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 16 | 39 | 46% |
| Orgânico | 0 | 0 | 5 | 16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 6 | 30 | 32% |

* ECOFF (mg/mL) > 16; Breakpoint (mg/L) ≥ 16

APÊNDICE D

Lista das 72 amostras analisadas no estudo demonstrando a identificação, grupo de amostra, marca, descrição do produto, estado de origem, peso e enumeração de coliformes totais (CT) e *E. coli*.

(Continua)

| ID_lab | Grupo | Marca | Data de produção | Descrição | Estado | <i>E. coli</i> .g ⁻¹ | CT.g ⁻¹ |
|--------|-------|-------|------------------|---|--------|---------------------------------|---------------------|
| 1 | GC | D | 01/06/19B | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | MT | 7,5 | 8,7 |
| 2 | GC | D | 07/12/2018 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | GO | 0 | 0 |
| 3 | GC | E | 16/04/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 4,8 | 8,9 |
| 5 | GC | E | 09/04/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0 | 1,7x10 ¹ |
| 6 | GC | E | 13/04/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0,3 | 3,0 |
| 7 | GC | B | 16/04/2019-1 | Frango congelado com miúdos | RS | 0,5 | 1,8 |
| 8 | GC | E | 28/05/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0,2 | 1,0 |
| 9 | GC | D | 13/02/2019 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | GO | 0,1 | 0,1 |
| 10 | GC | D | 21/11/2018 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | GO | 0 | 0 |
| 11 | GC | B | 07/01/19-7 | Frango congelado sem miúdos | RS | 0,3 | 0,7 |
| 12 | GC | E | 28/02/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 2,9 | 4,0 |
| 13 | GC | F | 25/05/2019 | Frango congelado sem miúdos | PR | 1,2x10 ¹ | 1,1x10 ² |

(continuação)

| ID_lab | Grupo | Marca | Data de produção | Descrição | Estado | <i>E. coli</i> .g ⁻¹ | CT.g-1 |
|--------|-------|-------|------------------|---|--------|---------------------------------|----------------------|
| 14 | GC | B | 08/01/19-1 | Frango congelado sem miúdos | RS | 0,7 | 2,1 |
| 15 | GC | F | 23/05/2019 | Frango congelado sem miúdos | PR | 7,3 | 1,8 x10 ¹ |
| 16 | GC | E | 12/04/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 1,7 | 2,8 |
| 17 | GC | E | 21/03/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0,4 | 1,3 |
| 18 | GC | E | 10/04/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0 | 0 |
| 19 | GC | E | 27/02/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | RS | 0,2 | 2,2 |
| 20 | GC | A | 22/05/2019-v | Frango congelado sem miúdos | PR | 0 | 0 |
| 21 | GC | D | 21/05/2019-1 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | MT | 0 | 0,2 |
| 22 | GC | D | B-26/12/2018 | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | GO | 0 | 0,2 |
| 23 | GC | B | 02/04/2019 | Frango congelado sem miúdos | RS | 0,3 | 0,5 |
| 24 | GC | D | 02/07/2019A | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | MT | 0,5 | 2,3 |
| 25 | GC | D | 11/07/19B | Frango congelado com pés, cabeça, pescoço, fígado e moela | MT | 0,2 | 2,8 |
| 27 | GO | C | 25.JUL.2019 | Frango congelado | SP | 1,1 | 2,4 |
| 28 | GO | C | 17.JAN.2019 | Frango congelado | SP | 0,2 | 2,9 |
| 29 | GO | C | 07.MAIO.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 1,9 |
| 30 | GO | C | 07.FEV.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 1,7 |
| 31 | GO | C | 17.JAN.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 3,2 x10 ⁴ |
| 32 | GO | C | 02.OUT.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 2,8 x10 ³ |
| 33 | GO | C | 17.JAN.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 8,9 x10 ² |
| 34 | GO | C | 04.JAN.2019 | Frango congelado | SP | 4,8 | 7,5 x10 ² |

(continuação)

| ID_lab | Grupo | Marca | Data de produção | Descrição | Estado | <i>E. coli</i> .g ⁻¹ | CT.g ⁻¹ |
|--------|-------|-------|------------------|--------------------------------|--------|---------------------------------|----------------------|
| 35 | GO | C | 12.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 1,2 | 1,1 x10 ² |
| 36 | GO | C | 04.JUN.2019 | Frango congelado | SP | 5,2 | 1,3 x10 ² |
| 38 | GO | C | 19.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 0,5 | 6,7 |
| 39 | GO | C | 04.ABR.2019 | Frango congelado | SP | 3,1 x10 ² | 2,1 x10 ³ |
| 40 | GO | C | 12.FEV.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 8,4 x10 ¹ |
| 41 | GO | C | 14.FEV.2019 | Frango congelado | SP | 0,7 | 1,2 x10 ² |
| 42 | GO | C | 04.ABR.2019 | Frango congelado | SP | 0,6 | 4,6 x10 ¹ |
| 44 | GO | C | 02.AGO.2019 | Frango congelado | SP | 1,9 | 4,5 x10 ² |
| 45 | GO | C | 07.MAIO.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 2,6 x10 ¹ |
| 46 | GO | C | 17.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 0,2 | 2,1 |
| 47 | GO | C | 24.JUL.2019 | Frango congelado | SP | 3,9 | 7,2 |
| 48 | GO | C | 12.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 3,6 | 4,7 |
| 49 | GO | C | 09.NOV.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 1,2 |
| 50 | GO | C | 12.JUN.2019 | Frango congelado | SP | 0,2 | 2,9 |
| 51 | GO | C | 05.ABR.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 1,0 |
| 52 | GO | C | 02.OUT.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 1,9 |
| 53 | GL | C | 12.NOV.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 0,7 |
| 55 | GL | E | 27.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0 | 0,8 |
| 56 | GL | C | 18.SET.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 3,1 |
| 57 | GL | C | 20.JUL.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 0,7 |
| 58 | GL | E | 26.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0 | 0,2 |
| 60 | GL | C | 24.SET.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 1,0 |
| 61 | GL | C | 13.JAN.2019 | Frango congelado | SP | 0,3 | 0,6 |
| 62 | GL | C | 15.FEV.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 5,7 |
| 63 | GL | E | 07.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 1,3 | 6,8 |
| 64 | GL | E | 11.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 8,2 | 9,3 |
| 65 | GL | E | 25.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 1,8 | 4,7 |
| 66 | GL | C | 11.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 0,2 | 1,3 x10 ¹ |
| 67 | GL | E | 14.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0,6 | 2,9 |
| 68 | GL | C | 19JUL.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 1,9 |
| 69 | GL | E | 13.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0,7 | 1,5 |
| 70 | GL | C | 23JUL.2018 | Frango congelado | SP | 0,2 | 1,7 |
| 71 | GL | C | 19.JUL.2019 | Frango congelado | SP | 1,9 | 3,1 x10 ² |
| 72 | GL | E | 28.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 1,0 | 1,5 |
| 73 | GL | C | 11.MAR.2019 | Frango congelado | SP | 0 | 1,3 |

(conclusão)

| ID_lab | Grupo | Marca | Data de produção | Descrição | Estado | <i>E. coli</i>.g⁻¹ | CT.g-1 |
|---------------|--------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
| 74 | GL | E | 19.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0,7 | 1,2 |
| 75 | GL | C | 17.JUL.2018 | Frango congelado | SP | 0 | 1,0 |
| 76 | GL | E | 28.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 3,3 | 3,5 |
| 77 | GL | E | 19.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0,1 | 1,7 |
| 78 | GL | E | 05.03.2019 | Frango congelado sem miúdos | SP | 0,2 | 0,4 |

GC: grupo convencional; GL: grupo livre de antibióticos; GO: grupo orgânico. CT: coliformes totais. Estado: região na qual está localizado o frigorífico abatedouro correspondente ao SIF da carcaça.

APÊNDICE E



Acta Scientiarum Veterinariae, 2020, 48: 1743.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1743

ISSN 1679-9216

In-Depth Genomic Characterization of a Meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* Strain Contaminating Chicken Carcass

Tatiana Regina Vieira¹, Gustavo Enck Sambrano¹, Núbia Michelle Vieira da Silva², Priscylla Carvalho Vasconcelos², Esther Ferraza Cavlinatto de Oliveira¹, Celso José Bruno de Oliveira^{2,4}, Samuel Paulo Cibulski² & Marisa Cardoso¹

ABSTRACT

Background: The indiscriminate use of antibiotics in food-animal production has a major impact on public health, particularly in terms of contributing to the emergence and dissemination of antimicrobial resistant bacteria in the food-animal production chain. Although *Pseudomonas* species are recognized as important spoilage organisms in foodstuff, they are also known as opportunistic pathogens associated with hospital-acquired infections. Furthermore, *Pseudomonas* can play a role as potential reservoirs of antimicrobial resistance genes, which may be horizontally transferred to other bacteria. Considering that cephalosporins (3rd and higher generations) and carbapenems are critically important beta-lactam antimicrobials in human medicine, this study reports the occurrence and genomic characterization of a meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* strain recovered from a chicken carcass in Brazil.

Materials, Methods & Results: During the years 2018-2019, 72 frozen chicken carcasses were purchased on the retail market from different regions in Brazil. Aliquots from individual carcass rinses were screened for Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria in MacConkey agar supplemented with 1mg.L⁻¹ cefotaxime. Phenotypically resistant isolates were further tested for resistance to other antimicrobials and confirmed as ESBL-producers by means of disk-diffusion method using Müller-Hinton agar. Only one meropenem-nonsusceptible isolate was detected and submitted to whole genome sequencing (WGS) in Illumina Miseq. The strain was identified as *Pseudomonas otitidis* by local alignment of the 16S rRNA sequence using BLASTn and confirmed by Average Nucleotide Identity (ANI) analysis using JSpeciesWS database. Genes encoding for antimicrobial resistance were detected by means of Resfinder and Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) databases. The phenotypic non-susceptibility to meropenem was attributed to the gene *bla*_{POM-1}. A total of 192 different genes encoding for quorum sensing system, antiphagocytosis, iron uptake, efflux pump, endotoxin and toxin, adherence, and secretion systems were detected by means of Virulence Factor Database (VFDB). *Pseudomonas otitidis*-pan genome was built using Roary-rapid large-scale prokaryote pan genome analysis using the present strain (K_25) and other two *P. otitidis* genomes (PAM-1, DSM 17224) publicly available at the NCBI. The core genome analysis of the two human strains resulted in similar percentages.

Discussion: Carbapenems are critically important drugs for human health and bacterial strains resistant to these antimicrobials pose a public health problem. The *bla*_{POM-1} gene harbored by the *Pseudomonas otitidis* K_25 strain encodes a metallo-beta-lactamase (MBL) conferring resistance to carbapenems. *Pseudomonas otitidis* was the first confirmed pathogenic *Pseudomonas* species expressing MBL constitutively in the absence of inducible beta-lactamase genes. Furthermore, the several virulence genes associated with the capacity of the *P. otitidis* K_25 to colonize, evade the immune system and cause lesions in the human host confirm this strain as a potential opportunistic pathogen contaminating foodstuff. These reinforce the need to address antimicrobial resistance in a One Health perspective, in which resistant bacteria and resistance determinants circulate among environment, animals and humans.

Keywords: carbapenem-resistance, POM-1, *Pseudomonas otitidis*, Brazil.

Descritores: resistência bacteriana, Meropenem, *Pseudomonas otitidis*, Brasil.

DOI: 10.22456/1679-9216.103176

Accepted: 4 June 2020

Published: 3 July 2020

Received: 3 March 2020

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias & ³Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia (Chiotec), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, PB, Brazil. ⁴Global One Health Initiative (GOHI), The Ohio State University, Columbus, OH, USA. CORRESPONDENCE: T.R. Vieira [tatianareginavieira@gmail.com]. Faculdade de Medicina Veterinária - UFRGS. Av. Bento Gonçalves n. 9090. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUCTION

Pseudomonas are opportunistic pathogens often related to complicated nosocomial infections in humans. Moreover, *Pseudomonas* species harbor intrinsic and acquired antimicrobial resistance mechanisms, leading to hard-to-treat infections [16] with severe disease outcome as a result of various virulence factors such as flagellum, pili, protein secretion systems, exoenzymes, lectins, quorum sensing and biofilm matrix synthesis [9,10,24].

In foods, *Pseudomonas* species are recognized as important spoilage bacteria [22] causing significant economic losses in the food industry [18]. Among these species, *Pseudomonas otitidis* was first described in patients diagnosed with acute otitis [6], and has thereafter been isolated from environmental sites and foodstuffs [15,23,28,29].

The majority of the studies about antimicrobial resistance in foods address only food-borne pathogens and microbial indicators, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. Therefore, the role of spoilage bacteria as potential reservoirs of antimicrobial resistance genes that can be transmitted to other bacteria is practically untapped. Among the antimicrobials of the beta-lactam class, cephalosporins (3rd and higher generation) and carbapenems are critically important drugs in human medicine, as bacterial pathogens that are resistant to these antimicrobial agents pose a public health concern globally [26]. Therefore, information regarding the mechanisms associated with bacterial resistance against these drugs is critical to tackle the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. This study aimed at providing in-depth genomic characterization of a meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* recovered from chicken carcass in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples

During the years 2018-2019, 72 frozen chicken carcasses were purchased on retail market from different cities in Brazil in order to investigate the occurrence of Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL) producing- and carbapenem-resistant enterobacteria. Frozen chicken carcasses were collected in their original packaging and kept refrigerated at 4°C for defrosting

before processing. After the removal of the plastic package and the giblets, the carcasses were placed into sterile plastic bags and weighted. Four hundred milliliters of buffered peptone water (BPW 1%) were added into the bag, and the carcass was rinsed for approximately one minute.

Screening for ESBL and resistance to carbapenems

Aliquots (30 mL) from the carcass-rinses were cultured in non-selective enrichment broth (BPW 1%) at 37° for 18-22h. Thereafter, one loopful (10 µL) of the overnight culture was transferred to MacConkey¹ agar plates containing 1 mg.L⁻¹ of cefotaxime² (CTX agar) and incubated at 44°C ± 0.5°C for 18-22 h. Up to three colonies per sampled carcass were individually picked, streaked onto CTX agar and cultivated at 37°C ± 1°C for 18-22 h. In order to screen for ESBL producing- and carbapenem resistant bacteria, each isolate was tested for antimicrobial susceptibility to cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg) and meropenem (10 µg) disks¹ by means of disk-diffusion method using Müller-Hinton¹ agar [7,8]. *Escherichia coli* ATCC^o 25922 was used for quality control purposes.

Isolates identification and antimicrobial susceptibility test

The isolates were phenotypically identified by means of biochemical procedures as previously described [17]. Further antimicrobial resistance profiling was determined by disk-diffusion test, against the following drugs¹: amikacin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), imipenem (10 µg), gentamicin (10 µg), levofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg) and tobramycin (10 µg). The minimum inhibitory concentration (MIC) of colistin² was determined by broth microdilution method using cation-adjusted Muller-Hinton broth¹ (CAMHB) [7].

Sequencing and analysis

Genomic DNA was extracted using Mag-MAXTM CORE Nucleic Acid Purification Kit³ according to the manufacturer's instructions. DNA integrity was visually assessed on 1% agarose gel and quantified by fluorometry (Qubit)⁴. The genomic library was prepared by means of Nextera XT DNA Library⁵. Fragment sizes were evaluated using a capillary electrophoresis system (Fragment Analyzer)⁶, and paired-end sequenced in Illumina MiSeq⁵ using a 2x250 cycle V2 kit⁵.

Fastqc tool (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) was used to check the quality of the reads, followed by trimming of Illumina adapters and low-quality reads (Phred score < 30) using Trimmomatic (available from usadellab.org/cms/index). Genome assembly was performed using SPAdes [1] and Abyss [21]. The assembly quality was assessed in QUAST [11] and the best result was obtained using SPAdes with a k-mer of 77. In order to improve the assembly metrics in terms of N50, we used the AlignGraph tool [2]. Before running AlignGraph tool, a dotplot similarity matrix by means of pairwise alignments was obtained using the web platform D-GENIES [5].

The strain was identified by local alignment of the 16S rRNA sequence using BLASTn and confirmed by Average Nucleotide Identity (ANI) analysis using JspeciesWS database [19] (available from jspecies.ribohost.com). Barnmap (<http://www.vicbioinformatics.com/software/barnmap.shtml>) was used to extract the 16S rRNA sequence for identification. The genome annotation was performed under the automatic NCBI pipeline submission system. Roary-rapid large-scale prokaryote pan genome analysis (academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btv421) was used to build a pangenome.

Genes encoding for antimicrobial resistance were screened by means of ResFinder 3.2 (available from cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) and CARD (available from <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>). Virulence factors were investigated using the Virulence Factor Database (VFDB) [13].

RESULTS

From the 72 frozen chicken carcasses, 55 (76.4%) were positive for microbiological isolation in CTX agar. A total of 164 colonies were screened for resistance to meropenem and cephalosporins. After screening, only one isolate showed non-susceptibility to meropenem, while it was susceptible to all tested cephalosporins. This isolate was phenotypically assigned within the *Pseudomonas* genus. Further determination of antimicrobial resistance profiling demonstrated that the isolate was susceptible to amikacin, ciprofloxacin, imipenem, gentamicin, levofloxacin, norfloxacin and tobramycin. The MIC of colistin was determined at 2 mg.L⁻¹, below the resistance breakpoint (≥ 4 mg.L⁻¹) [8].

Since meropenem-resistance is not a frequent feature among bacteria from foodstuffs, we decided to further characterize the strain, which was registered in the culture collection as K_25. The whole genome sequencing (WGS) was performed and the genome sequence was estimated as 6,406,500 bp long with 67.06% of GC (Table 1).

The local alignment of the 16S rRNA sequence using BLASTn identified the strain K_25 as *Pseudomonas otitidis*. The Average Nucleotide Identity (ANI) resulted in a 0.99 cutoff value compared with the reference *P. otitidis*, indicating that the strain was correctly identified. The genome annotation was performed under the automatic NCBI pipeline submission system. The draft genome sequence of *P. otitidis* K_25 is available at GenBank under the accession no. NZ_WTFN000000000.

There were only two available *Pseudomonas otitidis* strains (PAM1 and DSM17224) available at the NCBI database: DSM 17224 - FOJP000000000 isolated in 2016 in the United States; and PAM-1-PXJI000000000 isolated in 2018 in Lebanon, both from humans. The results demonstrated that the *P. otitidis* K_25 genome was not very close to any of the two references. As expected, AlignGraph results did not produce any extension of the contigs.

The pangenome was built with the present strain (K_25) and the other two reference strains (PAM-1, DSM 17224). The obtained pangenome consisted of a total of 7,463 genes while the core genome presented a total of 4,595 genes, which comprised 71.25% of the entire genome of the K_25 strain. The analysis of the two human strains resulted in similar percentages. In addition, *P. otitidis* K_25 was found to harbor a 2,389 bp plasmid. The cryptic plasmid had a GC content of 60.7% and four open reading frames (ORFs), one encoding for replication protein (rep) and the others encoding hypothetical proteins.

The resistome analysis identified the gene *bla*_{POM-1} (98.78% id - accession number GU002295). No other antimicrobial resistance gene was found. One hundred and ninety-two (192) virulence factors were identified by VFDB. Genes encoding for quorum sensing system, antiphagocytosis, iron uptake, efflux pump, endotoxin and toxin, adherence, and secretion systems were detected (Table 1). From the 192 genes carried by strain *P. otitidis* K_25, 84.3% are also present in *P. aeruginosa*.

T.R. Vieira, G.E. Sambrano, N.M.V. Silva, et al. 2020. In-Depth Genomic Characterization of a Meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* Strain Contaminating Chicken Carcass. *Acta Scientiae Veterinariae*. 48: 1743.

Table 1. Genomic and epidemiological features of the first meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* from chicken carcass at retail market in Brazil.

| Features | | <i>Pseudomonas otitidis</i> K_25 |
|--------------------------------------|--|----------------------------------|
| Genome data | | |
| Genome size (Mb) | | 6,4 |
| Contigs (> 200 bp) | | 735 |
| GC content (%) | | 67,06 |
| Number of genes | | 6.449 |
| CDSs | | 6.379 |
| tRNAs | | 58 |
| Epidemiological Genomic Data | | |
| Virulence factors ^a Class | | Number of related genes |
| Adherence | | 95 |
| Antiphagocytosis | | 29 |
| Enzyme | | 2 |
| Iron uptake | | 16 |
| Protease | | 1 |
| Quorum sensing | | 1 |
| Regulation | | 6 |
| Secretion system | | 25 |
| Toxin | | 2 |
| Amino acid and purine metabolism | | 1 |
| Efflux pump | | 1 |
| Endotoxin | | 1 |
| Glycosylation system | | 1 |
| Immune evasion | | 4 |
| Invasion | | 3 |
| Iron acquisition | | 1 |
| Magnesium uptake | | 1 |
| Serum resistance | | 1 |
| Stress adaptation | | 1 |
| Total | | 192 |
| Resistome ^{b,c} | | |
| Beta-lactam ^b | | <i>bla</i> _{POM-1} |

^a<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>; ^b<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>; ^c<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>

DISCUSSION

The genomic analysis revealed *bla*_{POM-1} gene as the mechanism of meropenem non-susceptibility harboured by the *P. otitidis* strain (K_25) isolated from chicken carcass. The resistance gene *bla*_{POM-1} encodes for the production of a metallo-beta-lactamase (MβL), which is known to confer resistance to carbapenems [4]. The gene *bla*_{POM} seems to be highly conserved and constitutively expressed in *P. otitidis* [25]. While the expression of POM MBL does not necessarily confers a carbapenem-resistant phenotype in some *P. otitidis* strains, the strain *P. otitidis* K_25 reported in this study showed a reduced susceptibility to meropenem. Other resistance genes were not identified, and the strain was phenotypically susceptible to all other tested antimicrobials. As previously reported in other POM MBL-expressing strains [12], K_25 was susceptible to cephalosporins. This beta-lactam resistance profile is unusual in the *Pseudomonas* genus [12]. *Pseudomonas otitidis* was the first pathogenic *Pseudomonas* species constitutively expressing MBL in the absence of inducible beta-lactamase genes [25]. It has been suggested that the gene *bla*_{POM} was originally acquired by horizontal transfer mechanisms, followed by recombination into the chromosome downstream of the conserved phosphonate operon, after divergence of *P. otitidis* from the other species [25].

Carbapenems are not administered to food animals [27] and resistance to this antimicrobial group is still low in bacteria isolated from foodstuffs and environment [3]. Still, spoilage *Pseudomonas* species showing resistance to carbapenems have been reported in pork, chicken and dairy products [18,28]. In *Pseudomonas*, carbapenem resistance is usually attributable to self-induced physiological changes triggered by several factors. The exposure to other antimicrobials has been suggested as a possible driver for the emergence of carbapenem resistance [3]. The origin and relevance of these carbapenem-resistant spoilage bacteria are still unclear. Most probably they are environmental bacteria that contaminate foodstuffs during processing and can reach the consumer through retail market. In the great majority of the cases, heat treatment of foods can destroy these contaminants and the proper handling of foods during preparation can mitigate their transmission to humans. Despite these aspects, the detection of viable *P. otitidis* harboring several virulence factors in chicken carcass at retail

market highlights the potential role of spoilage bacteria as opportunistic pathogens [6]. Interestingly, *P. otitidis* K_25 shared 84.3% of the virulence genes harbored by *P. aeruginosa*, which is the reference pathogenic species that is able to colonize, evade the immune system and cause lesions in the human host [20]. These findings, corroborate the potential of *P. otitidis* K_25 to cause disease in humans.

The findings of the present study shed light on the potential role of spoilage bacteria in foodstuffs as opportunistic pathogens and reservoirs of antimicrobial resistance genes. Antimicrobial resistance should be addressed in a One Health perspective, as resistant bacteria and resistance determinants circulate among environment, animals and humans. In any of these interconnected compartments, bacteria are exposed to different selective drivers that affect fitness and evolution of strains, and these events may later reflect in the other compartments [14]. Moreover, in-depth genomic information of organisms in foodstuff, such as those provided in this investigation, can support evolutionary and epidemiologic studies addressing beta-lactam

resistance among Gram-negative species, which can ultimately contribute to mitigate antimicrobial resistance in the animal-food industry.

CONCLUSION

The in-depth genomic characterization of a *bla*_{POM-1}-mediated meropenem-nonsusceptible *P. otitidis* K_25 strain from a chicken carcass highlights that spoilage bacteria in foodstuff can serve as reservoirs of genes conferring resistance against critically important antimicrobial drugs in human medicine.

MANUFACTURERS

¹Oxoid™. Hampshire, UK.

²Sigma-Aldrich. Darmstadt, Germany.

³Applied Biosystems™. Foster City, CA, USA.

⁴Life Technologies. Carlsbad, CA, USA.

⁵Illumina Inc. Hayward, CA, USA.

⁶Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

REFERENCES

- 1 Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A. & Pevzner P.A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 19(5): 455-477.
- 2 Bao E., Jiang T. & Girke T. 2014. AlignGraph: Algorithm for secondary de novo genome assembly guided by closely related references. *Bioinformatics*. 30(12): 319-328.
- 3 Bonardi S. & Pitino R. 2019. Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian Journal of Food Safety*. 8(2): 7956.
- 4 Borgianni L., De Lucca F., Thaller M.C., Chong Y., Rossolini G.M. & Docquier J.D. 2015. Biochemical characterization of the POM-1 metallo-β-lactamase from *Pseudomonas otitidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(3): 1755-1758.
- 5 Cabanettes F. & Klopp C. 2018. D-GENIES: Dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way. *PeerJ*. 6: e4958. [Fonte: <<https://peerj.com/articles/4958/>>]
- 6 Clark L.L., Dajes J.J., McLean C.H., Bartell J.G. & Stroman D.W. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(4): 709-714.
- 7 Clinical and Laboratory Standard Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th edn. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- 8 Clinical and Laboratory Standard Institute. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th edn. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute. 2020. Disponível em: <<http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED30:2020&scope=user>>.
- 9 Feng K., Li R., Chen Y., Zhao B. & Yin T. 2015. Sequencing and analysis of the *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A genome: A pathogen living in the surface coat of *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS ONE*. 10(10): e0141515.
- 10 Fernández M., Porcel M., De La Torre J., Molina-Henares M.A., Daddaoua A., Llamas M.A., Roca A., Carriel V., Garzón I., Ramos J.L., Alaminos M. & Duque E. 2015. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Frontiers in microbiology*. 6: 871. [Fonte: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00871/full>>].

T.R.Vieira, G.E.Sambrano, N.M.V.Silva, et al. 2020. In-Depth Genomic Characterization of a Meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* Strain Contaminating Chicken Carcass. *Acta Scientiae Veterinariae*, 48: 1743.

- 11 Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N. & Tesler G. 2013. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29(8): 1072-1075.
- 12 Lee K., Kim C., Young D., Yum J.H., Chung M. & Chong Y. 2011. POM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas otitidis* isolate from a patient with chronic otitis media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 72: 295-296.
- 13 Liu B., Zheng D., Jin Q., Chen L. & Yang J. 2019. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*. 47(D1): D687-D692.
- 14 McEwen S.A. & Collignon P.J. 2018. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiology Spectrum*. 6(2): ARBA-0009-2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
- 15 Nishiyama N., Uechi K., Nakamatsu M., Kinjo T. & Fujita J. 2018. Three cases of POM-1 metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas otitidis* isolated from respiratory specimens. *Respirology*. 23: 307-308.
- 16 Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J. & Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 37(1): 177-192.
- 17 Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Hartigan P.J., Fanning S. & Fitzpatrick E.S. 2011. Enterobacteriaceae. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd edn. Ames: Wiley-blackwell, pp.263-286.
- 18 Quintieri L., Fanelli F. & Capuyo L. 2019. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. *Foods*. 8(9): E372. [Fonte: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/9/372/html>>].
- 19 Richter M., Rosselló-Móra R., Oliver Glöckner F. & Peplies J. 2016. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 32(6): 929-931.
- 20 Rocha A.J., Barsottini M.R.O., Rocha R.R., Laurindo M.V., Leandro F., Moraes F.L.L. & Rocha S.L. 2019. *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 62: e19180503. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180503.
- 21 Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Schein J.E., Jones S.J. & Birol I. 2009. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*. 19(6): 1117-1123.
- 22 Stellato G., Utter D.R., Voorhis A., De Angelis M., Eren A.M. & Ercolini D. 2017. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. *Frontiers in Microbiology*. 8: 264. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00264. [Fonte: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00264/full>>].
- 23 Tan H., Zhang Z., Hu Y., Wu L., Liao F., He J., Luo B., He Y., Zuo Z., Ren Z., Peng G. & Deng J. 2015. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading zearalenone. *Food Control*. 47: 285-290.
- 24 Taybali A.F., Coleman G. & Nguyen K.C. 2015. Virulence attributes and host response assays for determining pathogenic potential of *Pseudomonas* strains used in biotechnology. *PLoS ONE*. 10(11): e0143604.
- 25 Thaller M.C., Borgianni L., Di Lallo G., Chong Y., Lee K., Dajcs J., Stroman D. & Rossolini G.M. 2011. Metallo-Lactamase Production by *Pseudomonas otitidis*: a Species-Related Trait. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(1): 118-123.
- 26 World Health Organization. 2018. Antimicrobial resistance (WHO Fact sheet). Geneva: World Health Organization; February. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>>
- 27 World Health Organization. 2019. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf>.
- 28 Wong M.H., Chan E.W. & Chen S. 2015. Isolation of carbapenem-resistant *Pseudomonas* spp. from food. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 3(2): 109-114.
- 29 Wu J., Jung B.G., Kim K.S., Lee Y.C. & Sung N.C. 2009. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* WL-13 and its capacity to decolorize triphenylmethane dyes. *Journal of Environmental Sciences*. 21(7): 960-964.

APÊNDICE F

Distribuição dos genes de resistência por sistema de produção.

| Gene | Resistência | Continua | | |
|------------------------|------------------|----------|----|----|
| | | GC | GL | GO |
| AAC(6')-Ib7 | Aminoglicosídeos | - | | |
| AAC(6')-Ib9 | Aminoglicosídeos | - | - | |
| AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia | Aminoglicosídeos | - | | - |
| AAC(6')-Ii | Aminoglicosídeos | - | | - |
| aadS | Aminoglicosídeos | | | - |
| ACC-1 | Betalactâmicos | - | | - |
| acrA | Bomba de efluxo | | | |
| acrB | Bomba de efluxo | | | |
| acrD | Bomba de efluxo | - | - | |
| acrE | Bomba de efluxo | | - | |
| acrF | Bomba de efluxo | - | - | |
| acrS | Bomba de efluxo | | - | - |
| ACT-10 | Betalactâmicos | | | |
| ACT-13 | Betalactâmicos | | | |
| ACT-29 | Betalactâmicos | | | |
| ACT-3 | Betalactâmicos | | - | |
| ACT-38 | Betalactâmicos | | - | - |
| ACT-4 | Betalactâmicos | - | | |
| ACT-6 | Betalactâmicos | | - | |
| ACT-8 | Betalactâmicos | | | |
| adeJ | Bomba de efluxo | | - | |
| ampC | Betalactâmicos | - | - | |
| ANT(3'')-IIa | Aminoglicosídeos | | - | - |
| ANT(4')-Ib | Aminoglicosídeos | - | | |
| APH(3'')-Ib | Aminoglicosídeos | | - | - |
| APH(3')-IIIa | Aminoglicosídeos | | | |
| APH(3')-VI | Aminoglicosídeos | | | |
| APH(3')-VIa | Aminoglicosídeos | | | |
| APH(6)-Id | Aminoglicosídeos | | - | - |
| arlR | Bomba de efluxo | | - | - |
| arlS | Bomba de efluxo | | - | |
| arnA | Polimixinas | | | |
| axyY | Bomba de efluxo | - | - | |
| bacA | Polimixinas | - | | - |
| baeS | Aminoglicosídeos | - | | |
| BcI | Betalactâmicos | - | - | |
| CARB-5 | Betalactâmicos | - | - | |
| cmeA | Bomba de efluxo | - | - | |
| cmeB | Bomba de efluxo | - | - | |
| cmlA1 | Fenicol | | - | - |

(continuação)

| Gene | Resistência | GC | GL | GO |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| cmr/cmiA | Bomba de efluxo | | - | - |
| CPS-1 | Betalactâmicos | - | - | |
| cpxA | Aminoglicosídeos | | - | - |
| CRP | Bomba de efluxo | | | |
| cyaA | Fosfomicina | | - | |
| dfrA12 | Trimetoprim | - | - | |
| dfrD | Trimetoprim | | | - |
| dfrK | Trimetoprim | - | | |
| efrA | Bomba de efluxo | - | | |
| efrB | Bomba de efluxo | - | - | |
| emeA | Bomba de efluxo | - | - | |
| emrA | Quinolonas | | - | - |
| emrK | Tetraciclina | | - | - |
| emrR | Quinolonas | | - | |
| emrY | Tetraciclina | - | | - |
| eptA | Polimixinas | | - | |
| ermA | MLSB | | - | - |
| ermB | MLSB | | | - |
| ermC | MLSB | | | - |
| ermF | MLSB | - | | - |
| ermG | MLSB | - | | - |
| fosA2 | Fosfomicina | | | |
| fosB | Fosfomicina | | - | |
| fosB1 | Fosfomicina | - | | - |
| fosD | Fosfomicina | - | - | |
| fusF | Ácido fusílico | | | - |
| gadX | Bomba de efluxo | | - | - |
| H-NS | Bomba de efluxo | | - | - |
| ICR-Mo | Polimixinas | - | | |
| IND-6 | Betalactâmicos | - | | |
| lamB | Regulador | | | |
| lmrD | Lincosamidas | - | | |
| lmrS | Bomba de efluxo | - | - | |
| lnuA | Lincosamidas | | | |
| lnuB | Lincosamidas | - | | - |
| lnuC | Lincosamidas | | | |
| lsaA | Outros | - | - | |
| lsaE | Outros | - | | |
| marA | Bomba de efluxo | - | - | |
| mdtB | Aminocumarim | | | |
| mdtC | Aminocumarim | - | - | |

(continuação)

| Gene | Resistência | GC | GL | GO |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| mdtE | Bomba de efluxo | | | - |
| mdtF | Bomba de efluxo | | - | - |
| mdtH | Quinolonas | | - | - |
| mdtM | Bomba de efluxo | - | - | |
| mdtO | Bomba de efluxo | | - | |
| mef(En2) | Macrolídeos | | - | - |
| mel | Macrolídeos | - | | - |
| mepA | Bomba de efluxo | | - | |
| mepR | Bomba de efluxo | | - | |
| mexB | Bomba de efluxo | | | |
| mexF | Bomba de efluxo | | | |
| mexK | Bomba de efluxo | | | |
| mexQ | Bomba de efluxo | - | - | |
| mexW | Bomba de efluxo | - | | |
| MFS | Bomba de efluxo | | - | - |
| mipA | Quinolonas | | - | - |
| mphC | Macrolídeos | | - | |
| msbA | Nitroimidazol | - | | |
| msrA | Macrolídeos | | | - |
| msrC | Macrolídeos | - | - | |
| mupA | Mupirocina | - | | - |
| muxB | Bomba de efluxo | - | | - |
| norA | Quinolonas | | - | - |
| omp1 | Betalactâmicos | - | - | |
| ompA | Betalactâmicos | | | |
| ompC | Betalactâmicos | | - | |
| ompK36 | Betalactâmicos | - | - | |
| opmH | Triclosan | - | | |
| oqxA | Bomba de efluxo | | - | |
| oqxB | Bomba de efluxo | | | |
| OXA-211 | Betalactâmicos | | - | |
| OXA-212 | Betalactâmicos | | | |
| OXA-275 | Betalactâmicos | | | |
| OXA-280 | Betalactâmicos | - | - | |
| OXA-281 | Betalactâmicos | - | - | |
| OXA-309 | Betalactâmicos | | - | - |
| qacB | Quinolonas | - | - | |
| qacE | Bomba de efluxo | | - | |
| QnrB19 | Quinolonas | - | - | |
| qnrD1 | Quinolonas | - | - | |
| ramA | Regulador | | | |

(conclusão)

| Gene | Resistência | GC | GL | GO |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| rosa | Polimixinas | - | - | |
| rosB | Polimixinas | - | - | |
| rpoB | Rifamicina | | - | |
| salA | Outros | - | | |
| SAT-2 | Aminoglicosídeos | | - | - |
| smeC | Bomba de efluxo | - | | - |
| smeD | Bomba de efluxo | | - | - |
| smeE | Bomba de efluxo | - | | |
| spd | Aminoglicosídeos | | | |
| sul2 | Sulfonamidas | | - | - |
| tet(38) | Tetraciclinas | | - | |
| tet(39) | Tetraciclinas | - | | |
| tet(A) | Tetraciclinas | | - | - |
| tet(C) | Tetraciclinas | - | - | |
| tet(K) | Tetraciclinas | | | |
| tet(L) | Tetraciclinas | | | |
| tet(W/N/W) | Tetraciclinas | | | |
| tet(Y) | Tetraciclinas | | - | - |
| tet(Z) | Tetraciclinas | | - | - |
| tet32 | Tetraciclinas | - | | |
| tet44 | Tetraciclinas | - | | - |
| tetM | Tetraciclinas | | | |
| tetO | Tetraciclinas | - | | |
| tetQ | Tetraciclinas | - | | |
| tetS | Tetraciclinas | | - | |
| tetW | Tetraciclinas | - | | |
| tolC | Bomba de efluxo | | - | - |
| triC | Triclosan | - | | |
| vanTC | Vancomicina | - | | - |
| vatE | Streptograminas | - | | |

Outros: resistência múltipla por proteção do alvo; MLSB: macrolídeo-lincosamida-streptogramina B; GC: grupo convencional; GL: grupo livre de antibióticos; GO: grupo orgânico.