

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE VETERINÁRIA – FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PPGCV

**INFLUÊNCIA DO USO DE ANTIMICROBIANOS NA RAÇÃO DE SUÍNOS
CRIADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE MEDICAÇÃO SOBRE RESISTÊNCIA
DE *Escherichia coli* E PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL**

CAROLINE PISSETTI

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE VETERINÁRIA – FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PPGCV

**INFLUÊNCIA DO USO DE ANTIMICROBIANOS NA RAÇÃO DE SUÍNOS
CRIADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE MEDICAÇÃO SOBRE RESISTÊNCIA
DE *Escherichia coli* E PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL**

Autora: Caroline Pissetti*

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

Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-orientadora: Dra. Jalusa Deon Kich

PORTO ALEGRE, 2016

* Medica Veterinaria MSc

Pissetti, Caroline

Influência do uso de antimicrobianos na ração de suínos criados com diferentes níveis de medicação sobre resistência de *Escherichia coli* e perfil da microbiota intestinal / Caroline Pissetti. -- 2016. 99 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.
Coorientadora: Jalusa Deon Kich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. resistência antimicrobiana. 2. suinocultura. 3. metagenômica. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Kich, Jalusa Deon, coorient. III. Título.

Caroline Pissetti

Influência do uso de antimicrobianos na ração de suínos criados com diferentes níveis de medicação sobre resistência de *Escherichia coli* e perfil da microbiota intestinal

Aprovado em 30 de março de 2016.

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Jalusa Deon Kich

Embrapa Suínos e Aves
Co-orientadora

Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Suínos
Membro da Comissão

Dra. Gertrudes Corção

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Membro da Comissão

Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi

Embrapa Suínos e Aves
Membro da Comissão

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Arlete e Luiz Pissetti,
meus maiores incentivadores...*

Agradecimentos

Agradeço a professora Dra. *Marisa Cardoso* pela excelente orientação, motivação, ensinamentos, amizade e principalmente pela paciência que sempre teve comigo. A Dra. *Jalusa Deon Kich* por todo incentivo e ensinamentos essenciais nesta etapa.

A Dra. *Heather Allen* pela orientação e ótimo convívio durante os 11 meses que fiz parte do seu grupo de pesquisa.

Aos amigos e colegas do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS que contribuíram para realização do projeto, que sempre ajudaram, através dos antibiogramas, das conversas e discussões. Em especial, agradeço a *Gabriela Werlang*, *Daniel Paim* e *Tatiana Vieira*.

Aos funcionários da Embrapa Suínos e Aves pelo auxílio durante as coletas e execução do projeto. Ao Dr. *Maurício Cantão* por toda a ajuda disponibilizada na área de bioinformática.

Aos professores Dr. *David Barcellos*, Dra. *Gertrudes Corção* e Dr. *José Pandolfi* pelas valiosas sugestões durante a qualificação. Agradeço também a Dra. *Débora Pellegrini* pelo auxílio nas etapas finais e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS (PPGCV) pela bolsa de estudo no Brasil e no exterior.

Agradeço aos meus pais, *Arlete* e *Luiz Pissetti*, por toda o companheirismo, confiança e compreensão em todos os momentos de ausência. Vocês são os meus maiores exemplos de honestidade e persistência; serei eternamente grata por tudo. A minha irmã, *Camilla Pissetti*, que mesmo longe, sempre me apoiou em todos os momentos desta caminhada.

A todos, muito obrigada!

INFLUÊNCIA DO USO DE ANTIMICROBIANOS NA RAÇÃO DE SUÍNOS CRIADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE MEDICAÇÃO SOBRE RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* E PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL

Autora: Caroline Pissetti¹

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-orientadora: Jalusa Deon Kich

RESUMO

Bactérias resistentes aos antimicrobianos representam um risco, não apenas para a saúde animal, como também para a saúde pública. As bactérias comensais, como *Escherichia coli*, são consideradas um bom indicador do padrão de resistência de uma população microbiana, uma vez que, por residirem no intestino, estão submetidas à constante pressão de seleção resultante da administração de antimicrobianos, podendo sobreviver ao processo de abate de suínos e chegar aos consumidores. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram: *i.* avaliar a frequência de resistência antimicrobiana fenotípica e a presença de grupos clonais em *E. coli* isoladas de fezes e carcaças suínas; *ii.* determinar o perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos em isolados multirresistentes de *E. coli* provenientes de carcaças de suínos e identificar grupos clonais presentes em carcaças suínas; *iii.* comparar o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração; *iv.* descrever o perfil da microbiota intestinal de suínos submetidos a diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração. Para isto, três etapas distintas foram realizadas. Na etapa 1, dois ciclos de amostragem foram conduzidos em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos, sendo coletado fezes depositadas no piso da pocilga de espera e suabes de superfície de carcaças na etapa de pré-resfriamento. *Escherichia coli* foi isolada dessas duas origens e avaliada quanto à resistência aos antimicrobianos. Além disso, 92 isolados de ambas as origens apresentando perfil de multirresistência foram submetidos à análise por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Para a etapa 2, os isolados multirresistentes provenientes de carcaças foram submetidos a novos testes de sensibilidade antimicrobiana e de acordo com o perfil fenotípico foram pesquisados quanto aos genes de resistências e submetidos à técnica de PFGE. Em relação a etapa 3, quatro grupos de suínos que utilizavam protocolos distintos de uso de antimicrobianos via ração foram acompanhados em todas as fases zootécnicas e avaliados quanto a frequência de resistência antimicrobiana de *E. coli* e perfil bacteriano da microbiota intestinal através do sequenciamento de duas regiões do gene 16S rRNA. Entre os 674 isolados de *E. coli* da etapa 1 apenas 7,4% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. As maiores frequências de resistência foram identificadas frente à tetraciclina (85,9%), ampicilina (73,0%), sulfonamida (70,0%), florfenicol (65,0%) e ácido nalidíxico (58,9%). Do total de isolados de *E. coli*, 79,5% (536/674) foram classificados como multirresistentes. A análise de macro restrição (PFGE), conduzida em isolados apresentando perfis de multirresistência mais prevalentes, demonstrou que isolados de fezes e carcaças eram na maioria dos casos relacionados (similaridade $\geq 70\%$) nos três matadouros-frigoríficos. Dos isolados multirresistentes provenientes das carcaças, dez novos antimicrobianos foram testados; em relação a esses, as maiores frequências de resistências foram à cloranfenicol (86,4%), estreptomicina (65,8%) e trimetoprima (57%). Cada matadouro-frigorífico apresentou um perfil distinto de multirresistência predominante. Nos isolados submetidos à

¹ Tese de Doutorado, Doutorado em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. (99p) Março, 2016.

pesquisa de genes de resistência, foram detectados por ordem de frequência: *strA* (83,3%); *aac(3)IVa* (70%); *tetB* (70%); *sul2* (60%); *floR* (56,6%); *tetA* (50%); *aph(3)Ia* (43,3%); *sul3* (26,6%) e *bla_{TEM}* (10%); três grupos de isolados relacionados (similaridade $\geq 70\%$) foram encontrados na análise por PFGE. Em relação à etapa 3, os grupos com diferentes protocolos de uso antimicrobianos via ração não apresentaram alteração significativa no perfil de microbiota intestinal e contagem de *E. coli*; entretanto, os perfis fenotípicos de resistência antimicrobiana foram distintos entre os grupos. O grupo que recebia protocolo com uso alternado de antimicrobianos de seis classes distintas apresentou maior frequência de resistência e multirresistência. De acordo com os resultados encontrados protocolos de uso continuado de antimicrobianos na criação de suínos gera uma pressão seletiva, resultando em cepas multirresistentes que podem sofrer propagação no ambiente e na cadeia de produção de alimentos. Considerando os perfis de resistência encontrados em *E. coli* originada de carcaças suínas e fezes, em todas as etapas deste trabalho, observou-se que essas cepas são selecionadas na granja pelo uso de antimicrobianos, chegaram ao pré-abate, disseminaram-se na linha de abate e contaminar a carcaça. O uso prudente de antimicrobianos é amplamente citado em toda a literatura científica veterinária e, conforme nossos resultados demonstraram, deve ser incluído entre as metas da suinocultura brasileira.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, *Escherichia coli*, metagenômica, suinocultura.

INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL ADMINISTRATION IN FEED OF PIGS RAISED WITH DIFFERENT MEDICATION LEVELS ON THE *Escherichia coli* RESISTANCE AND ON THE GUT MICROBIOTA PROFILE

Author: Caroline Pissetti¹

Adviser: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-adviser: Jalusa Deon Kich

ABSTRACT

Bacteria resistant to antimicrobials present a hazard not only for animal health but public health too. Commensal bacteria, such as Escherichia coli, are considered a good indicator of microbial population resistance, because they live in gut and are subjected to constant pressure resulting selection of the administration of antibiotics, may survive in slaughtering process and get consumers. In this sense, the aims of this study were: i. to evaluate the frequency of antimicrobial phenotype resistance and presence of clonal groups for E. coli isolated from feces and pig carcasses; ii. to determine phenotypic profile and antimicrobial genotypic resistance in multiresistant E. coli isolated from pig carcasses and identify clonal groups present in pig carcasses; iii. to compare phenotypic profile of antimicrobial resistance in E. coli from swine feces submitted to different antimicrobial in-feed protocols; iv. to describe gut microbiota profile in pigs submitted to different antimicrobial in-feed protocols. For this, three steps were performed. In step 1, two sampling cycles were conducted in three slaughterhouses (A, B, C) of pigs being collected feces deposited in pen floor and pre-chill carcasses. Escherichia coli was isolated from these two sources and evaluated for antimicrobial resistance. In addition, 92 isolates with multidrug resistance profile were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). In step 2, isolated from carcasses and multiresistant underwent new antimicrobial susceptibility testing and in accordance with the phenotypic profile were screened for the resistance gene and PFGE. In step 3, four groups of pigs used different antimicrobial in-feed protocols were followed in all phases and evaluated frequency of antimicrobial resistance and gut bacterial profile by sequencing two regions of 16S rRNA. Among the 674 E. coli isolates from step 1 just 7.4% were susceptible to all antibiotics. The highest frequencies of resistance were: tetracycline (85.9%), ampicillin (73.0%), sulfonamide (70.0%), florfenicol (65.0%) and nalidixic acid (58.9%). Of total E. coli isolates, 79.5% (536/674) were multidrug. Macrorestriction analysis (PFGE), conducted in isolates with profiles more prevalent multidrug resistance showed that isolated from feces and carcasses were in most cases related ($\geq 70\%$ similarity) in the three slaughterhouses. The multiresistant isolates from carcasses, ten new antibiotics were tested, with greatest frequency in add antimicrobial resistance were: chloramphenicol (86.4%), streptomycin (65.8%) and trimethoprim (57%). Each slaughterhouse showed a distinct profile of resistance and number of resistance markers. Isolates submitted to research genes were detected in order of frequency: strA (83.3%); aac(3)IV (70%); tetB (70%); sul2 (60%); floR (56.6%); tetA (50%); aph(3)Ia (43.3%); sul3 (26.6%) and bla_{TEM} (10%); and three related groups (similarity $\geq 70\%$) were formed in PFGE. For step 3, groups with different antimicrobial in-feed had no significant change in gut microbiota profile and E. coli counts; however the phenotypic profiles of antimicrobial resistance were different between the groups. The group receiving protocol with alternate use of antimicrobials six different classes showed higher frequency of resistance and multidrug resistance. According to the results, different protocols

¹ Doctoral Thesis, Doctor of Veterinary Science, Department of Preventive Veterinary Medicine, Graduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. (p.99), March, 2016.

of antimicrobial in pig farming creates a selective pressure, resulting in multi-drug resistant strains that may contribute to spread environment and in food production chain. Considering the resistance profiles found in E. coli originated from swine carcasses and feces, in all stages of this work, it was observed that these strains were selected for in farm by use of antimicrobials, reached the pre-slaughter, spread in the slaughterhouse and carcasses. The concept of prudent use of antimicrobials is widely quoted in all the veterinary scientific literature and, as our results showed, it should be included among the goals of the Brazilian pig farming.

Key-words: *antimicrobial resistance, Escherichia coli, metagenomic, pig farming.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Regiões conservadas (C1-C9) e regiões hipervariáveis (V1-V9) do gene 16S rRNA	38
FIGURA 2. Perfis de macro restrição e de multirresistência de isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos	54
FIGURA 3. Distribuição de isolados de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes, de acordo com a quantidade de marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana identificados, em três matadouro-frigoríficos (A, B e C).....	56
FIGURA 4. Perfis de macro restrição e de multirresistência de isolados de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes provenientes de carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos	59
FIGURA 5. Filos classificáveis referente aos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração, sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina).....	61
FIGURA 6. Composição da microbiota bacteriana no nível de gênero referente aos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração, sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina).....	62
FIGURA 7. Composição da microbiota bacteriana no nível de filo referente aos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de antimicrobianos via ração em 4 coletas distintas, sequenciados na plataforma IonTorrent PGM	63
FIGURA 8. Composição da microbiota bacteriana no nível de gênero referente aos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de antimicrobianos via ração em quatro coletas distintas, sequenciados na plataforma IonTorrent PGM.	64
FIGURA 9. Distribuição de isolados de <i>Escherichia coli</i>, de acordo com a quantidade de marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana identificados	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Quinolonas e fluoroquinolonas existentes.....	30
TABELA 2. Genes codificadores de resistência a antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> , oligonucleotídeos iniciadores, condições de amplificação e fragmento esperado na PCR.....	43
TABELA 3. Pulsos de antimicrobianos administrados via ração após o desmame de leitões do Grupo 2.....	45
TABELA 4. Núcleos e concentrados utilizados na ração fornecida aos suínos do Grupo 3.....	45
TABELA 5. Antimicrobianos utilizados via ração nas diversas fases zootécnicas dos suínos do Grupo 4.....	46
TABELA 6. Cronograma de coleta de fezes dos animais pertencentes aos quatro grupos de observação.....	47
TABELA 7. Coletas incluídas na análise do gene 16S rRNA do DNA total das fezes de suínos em cada um dos quatro grupos observados. Em cada coleta foram analisados quatro animais.....	49
TABELA 8. Coletas incluídas na análise do gene 16S rRNA do DNA total das fezes de suínos em cada um dos quatro grupos observados. Em cada coleta foram analisados quatro animais.....	50
TABELA 9. Frequência de isolados de <i>Escherichia coli</i> resistentes aos antimicrobianos em fezes e carcaças suínas em três matadouros-frigoríficos.....	52
TABELA 10. Perfis de multirresistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C).....	53
TABELA 11. Frequência de isolados de <i>Escherichia coli</i> originados de carcaças suínas resistentes à antimicrobianos, em três matadouros-frigoríficos.....	55

TABELA 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ciprofloxacina para isolados de <i>Escherichia coli</i> resistentes à ácido nalidíxico.....	56
TABELA 13. Cinco perfis de multirresistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C).....	57
TABELA 14. Contagem mínima, máxima e mediana de <i>Escherichia coli</i> em fezes de suínos pertencentes a grupos submetidos a quatro protocolos de administração de antimicrobianos via ração.....	65
TABELA 15. Frequência de resistência a antimicrobianos em isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração.....	66
TABELA 16. Dez perfis de resistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de <i>E. coli</i> provenientes de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Uso de antimicrobianos na suinocultura	20
2.2 Resistência aos antimicrobianos.....	22
2.2.1 Mecanismos de resistência às principais classes de antimicrobianos	24
<i>a) Resistência a β-lactâmicos</i>	24
<i>b) Resistência à aminoglicosídeos</i>	26
<i>c) Resistência às tetraciclinas</i>	27
<i>d) Resistência aos fenicóis</i>	28
<i>e) Resistência às sulfonamidas</i>	28
<i>f) Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas</i>	29
2.3 Ocorrência de resistência antimicrobiana em <i>Escherichia coli</i>	31
2.4 Microbiota intestinal	35
3. OBJETIVOS	39
3.1 Geral	39
3.2 Específico.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ETAPA 1: Determinação do perfil de resistência fenotípica e perfil clonal entre isolados de <i>Escherichia coli</i> de fezes e carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento....	40
4.1.1 <i>Delineamento experimental e colheita de amostras</i>	40
4.1.2 <i>Formação do grupo de isolados de Escherichia coli proveniente de fezes e carcaças</i>	41
4.1.3 <i>Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de Escherichia coli</i>	41
4.1.4 <i>Macro restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE)</i>	41
4.2 ETAPA 2: Determinação do perfil de genes de resistência em <i>Escherichia coli</i> provenientes de carcaça suínas na fase de pré-resfriamento.....	42
4.2.1 <i>Isolados selecionados e determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos adicionais</i>	42

<i>4.2.2 Pesquisa de genes de resistência em isolados de Escherichia coli multirresistentes e determinação de perfil de PFGE</i>	43
4.3 ETAPA 3: Determinação do perfil de resistência fenotípica em <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes e perfil de microbiota intestinal de suínos submetidos à diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração	44
<i>4.3.1 Delineamento</i>	44
<i>4.3.2 Contagem de Escherichia coli</i>	47
<i>4.3.3 Seleção de bactérias ESBL positivas</i>	47
<i>4.3.4 Determinação do perfil fenotípico de resistência antimicrobiana dos isolados de Escherichia</i>	48
<i>4.3.5 Análise de sequências do gene 16S rRNA com a Plataforma Ion Torrent PGM</i>	48
<i>4.3.6 Análise de sequências do gene 16S rRNA com a Plataforma MiSeq (Illumina)</i>	50
5. RESULTADOS	52
5.1 ETAPA 1: Determinação do perfil de resistência fenotípica e perfil clonal entre isolados de <i>Escherichia coli</i> de fezes e carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento	52
5.2 ETAPA 2: Determinação do perfil de genes de resistência em <i>Escherichia coli</i> provenientes de carcaça suínas na fase de pré-resfriamento	55
5.3 ETAPA 3: Determinação do perfil de resistência fenotípica em <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes e perfil de microbiota intestinal de suínos submetidos a diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração	60
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de carne suína está em constante expansão; nesse cenário, o Brasil ocupa a quarta colocação entre países produtores, com uma produção média de 3.470 mil toneladas, ficando atrás da China, União Europeia e Estados Unidos. No último ano, foi registrado um crescimento de 4,95%, na produção brasileira de carne suína de acordo com Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. Desta produção, 85,8% foi comercializado no mercado interno e 14,2% foi destinado à exportação, mantendo o Brasil como quarto maior exportador mundial, com 505 mil toneladas exportadas por ano (ABPA, 2015).

Os regulamentos nacionais e internacionais exigem que os produtos de origem animal sejam inócuos aos consumidores, ou seja, não carreadores de micro-organismos patogênicos, principalmente aqueles causadores de zoonoses. Adicionalmente, observa-se crescente preocupação relativa à resistência antimicrobiana na microbiota patogênica ou comensal veiculada por alimentos. As bactérias resistentes aos antimicrobianos, quando presentes em animais de produção, representam um risco não apenas para a saúde animal, como também para a saúde pública, uma vez que podem ser transmitidas aos humanos como contaminantes de alimentos. O *Codex Alimentarius* (Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas Alimentares) reconhece que a resistência antimicrobiana é um dos principais problemas de saúde pública global e uma questão de segurança dos alimentos, tanto em bactérias patogênicas quanto em comensais (CAC, 2011).

Pelo menos 25.000 pacientes na União Europeia e 23.000 nos Estados Unidos vêm à óbito, anualmente, por infecções causadas por bactérias multirresistentes. A administração não-terapêutica de antimicrobianos para animais, tem sido apontada como um dos fatores que contribuem para a multirresistência, fazendo com que os produtos de origem animal sejam indicados como potenciais veículos de disseminação dessas cepas (PANTOSTI, 2012). Em 2015, foi publicado o primeiro estudo sobre a relação entre o consumo de antimicrobianos, em seres humanos e animais de produção, e a resistência antimicrobiana em bactérias na União Europeia onde foi revelado um consumo de antimicrobianos maior em animais do que em seres humanos; entretanto, o consumo de drogas consideradas de maior importância, como fluoriquinolonas e cefalosporina de 3ª e 4ª geração, foi maior em humanos. A associação entre consumo e a correspondente resistência de bactérias foi encontrada nos dois casos, inclusive a relação entre o uso das drogas em animais e o aparecimento de resistência em bactérias

isoladas de humanos (ECDC/EFSA/EMA, 2015). Esta disseminação de genes de resistência não se restringe apenas aos isolados de mesma espécie, mas pode ocorrer entre diferentes espécies e gêneros, o que também constitui um importante fator de risco (SCHWARZ et al., 2006). Com isso, mudanças conceituais e práticas na produção animal têm sido debatidas e introduzidas em diversos países.

Em 1968, na Grã-Bretanha, foi criado o Comitê Misto para obter informações sobre a utilização de antimicrobianos em medicina veterinária com especial referência à resistência antimicrobiana. O Comitê buscou considerar as implicações do uso de antimicrobianos na produção animal e na saúde humana, além de elaborar recomendações para o uso prudente dos mesmos. A partir disso, foi publicado o relatório de *Swann*, no qual se recomendou a exclusão de todos os antimicrobianos que estavam prescritos como agentes terapêuticos em medicina humana ou veterinária da alimentação de animais, bem como aqueles associados com o desenvolvimento de resistência cruzada às drogas utilizadas em humanos (GUARDABASSI et al., 2010).

Em relação ao banimento do uso de antimicrobianos como aditivos em ração, a primeira recomendação foi emitida em 1997 pela Organização Mundial da Saúde (WHO). Em 1998, a Dinamarca foi o primeiro país a seguir esta recomendação. Durante os anos seguintes, a prevalência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos isolados de animais de produção, matadouros-frigoríficos, alimentos de origem animal e dos próprios humanos foi amplamente estudada, além do custo econômico do banimento para a produção animal no referido país. Em 2001, o consumo total de antimicrobianos na produção de suínos e aves havia diminuído 54%, em relação ao ano de 1994. Dessa forma, amostras de *Enterococcus* que demonstravam índices de resistência entre 60 a 80% em isolados de animais e alimentos de origem animal, apresentaram frequência de resistência de apenas 5 a 35% após a proibição. Essa recomendação causou prejuízos como o aumento na frequência de quadros de diarreia, ganho de peso mais lento em suínos, além do aumento de custo na produção em 1%; entretanto, os lucros totais da produção de carne suína aumentaram (FERBER, 2003). Agersø e Aarestrup (2013) concluíram que a interrupção do uso de cefalosporina na Dinamarca reduziu significativamente a ocorrência de *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Outros estudos, contudo, relataram que o banimento de antimicrobianos via ração em suínos resultou, em alguns casos, em prejuízo à saúde animal, sem a redução da frequência de isolados resistentes (PHILLIPS, 2007; WASSENAAR e SILLEY, 2008).

Na União Europeia, em 1999, a utilização de cinco moléculas relacionadas com medicamentos de uso na terapêutica humana foi proibida. Em 2006, essa proibição banuiu o uso de todos os antimicrobianos, como preventivo ou promotores de crescimento (aditivos) via ração, atendendo ao chamado “princípio da precaução”. No entanto, o uso terapêutico permanece autorizado, desde que o produto veterinário tenha sido aprovado pela Agência Europeia para Medicamentos (EMA) para utilização na espécie animal pretendida. Atualmente, estratégias para o uso de antimicrobianos estão traçadas até o ano de 2020 (ECDC/EFSA/EMA, 2015). Já os Estados Unidos adotaram o “princípio da prova”, pelo qual a suspensão do uso de uma droga deve ser precedida pela coleta de dados que evidenciem o surgimento da resistência. Esse programa de coleta de dados tem sido conduzido pelo *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS) em parceria com o *Food and Drug Administration* (FDA), Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Em 2013, foi criado um comitê para avaliar estes programas e determinar as metas até 2020, originando o *National Strategy for Combating Antibiotic Resistant Bacteria* – CARB.

O Brasil conta com o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRC), que é operacionalizado por meio de quatro subprogramas: Monitoramento; Investigação; Exploratório; e Monitoramento de Produtos Importados. Este programa tem como finalidade garantir a inocuidade dos alimentos quanto à presença de resíduos decorrentes do uso de drogas veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais. O limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR) tem como base as recomendações feitas pelo *Codex Alimentarius* (BRASIL, 1999) e são estabelecidos com base na análise toxicológica e farmacocinética da substância química, ou seja, do risco ou perigo que ela possa representar para a saúde humana. No entanto, leva em consideração o desaparecimento do resíduo, mas não abrange a seleção de cepas bacterianas resistentes. Em 2003, a ANVISA iniciou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) que entrou em vigor pela RDC nº 253, sendo implantado primeiramente com avaliação de leite bovino, incluindo outros alimentos como meta para os próximos anos (BRASIL, 2003). Entretanto, até 2015, nenhuma atualização do programa havia sido publicada.

Já o Programa Nacional de Farmacovigilância Veterinária, em vigor desde 2008 (BRASIL, 2008), tem como objetivo detectar, identificar, avaliar e monitorar os danos, eficácia, qualidade e riscos do uso dos produtos veterinários, aditivos anticoccidianos e aditivos melhoradores de desempenho à base de antibióticos registrados em todo o território

nacional e comercializados no Brasil e no exterior. Para o problema de resistência antimicrobiana, propriamente dita, está em vigor, desde 2004, o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) para os gêneros *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* e *Campylobacter* (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008). Em 2014, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantou o Programa Nacional de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos em Recursos Pesqueiros (BRASIL, 2014). Especificamente para suínos, não há um programa com essa abordagem. A única exigência para a suinocultura, segundo o MAPA, é a entrega de boletim sanitário dos lotes encaminhados ao abate, informando ao matadouro-frigorífico o uso de drogas terapêuticas e não terapêuticas, dosagem e período de carência.

Em relação aos aditivos zootécnicos, a Instrução Normativa nº 65/2006 cita que os produtos medicados, como ração, suplementos, premixes, núcleos ou concentrados, não podem conter antimicrobianos com os mesmos princípios ativos de medicamentos de uso terapêutico (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011). Alguns princípios ativos, como anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas, são de uso exclusivamente terapêutico em animais, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009). Outros princípios ativos como o cloranfenicol, nitrofuranos (BRASIL, 2003), olaquinox (BRASIL, 2004), carbadox (BRASIL, 2005), eritromicina e espiramicina (BRASIL, 2012) têm seu uso proibido sob qualquer forma.

Mesmo após o incremento da regulamentação de antimicrobianos em diversos países, o assunto permanece polêmico, principalmente, porque o banimento obriga a suinocultura a uma mudança no manejo dos animais, podendo levar a perdas produtivas numa lógica de produção intensiva, como é o caso do Brasil. Por outro lado, esse movimento parece ser irreversível, principalmente pelo fato da percepção do consumidor em vários países ser favorável ao não-uso de antimicrobianos. A tendência é que haja um efeito em cadeia no sentido do banimento e de modificações de manejo em todos os países que produzem carne suína e que desejam competir no mercado internacional (MILLET, 2010). Por este motivo, estudos relacionados à resistência antimicrobiana em isolados de origem animal são importantes para chegar a um diagnóstico do cenário atual e analisar o risco oferecido ao consumidor pelos produtos brasileiros de origem animal.

Diversos estudos relatam o isolamento de cepas resistentes em amostras provenientes de origem suína, ao longo de toda produção até o produto final, e em diferentes gêneros, como: *Campylobacter* (GEBREYES et al., 2005), *Salmonella* (GEBREYES et al., 2004;

MURMANN et al., 2009; GUERRA et al., 2011; KICH et al., 2011; LOPES et al., 2015), *Enterococcus* (CAMPOS et al., 2015), *Listeria* (FERRONATTO et al., 2012). Essas bactérias podem contaminar a carcaça durante o abate, ultrapassar as barreiras existentes durante o processamento do alimento e colonizar e multiplicar-se no trato gastrointestinal do consumidor (APLEY et al., 2001).

No cenário de produção de suínos no Brasil, são comumente encontradas granjas que utilizam antimicrobianos em todas as fases de criação, respeitando o período de carência, que varia de acordo com a droga utilizada, para obedecer a legislação relativa à presença de resíduos. A situação relativa à resistência antimicrobiana em bactérias que habitam o intestino de suínos criados de acordo com as práticas rotineiras de manejo, bem como a importância dessas bactérias na carcaça suína, ainda é pouco investigada. Da mesma forma, há dificuldade em estudar o cenário de resistência da microbiota intestinal em manejos que não utilizem antimicrobianos administrados como aditivos via ração, uma vez que essa prática não é adotada em granjas comerciais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o conhecimento da resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* em suínos e avaliar a influência do uso de antimicrobianos via ração na microbiota intestinal de suínos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de antimicrobianos na suinocultura

O uso de antimicrobianos na cadeia produtiva animal pode ser feito de quatro formas: como aditivo zootécnico ou melhoradores de desempenho, uso metafilático, profilático e/ou terapêutico. Na medicação como aditivo zootécnico, são utilizadas concentrações sub-terapêuticas de antimicrobianos. De acordo com a Instrução Normativa nº 26/2009, os antimicrobianos indicados como promotores de crescimento devem apresentar eficácia e segurança comprovada na dose e espécie alvo de indicação de uso (BRASIL, 2009). O modo de ação não está totalmente esclarecido, entretanto os mecanismos podem incluir uma redução da carga bacteriana total e o aumento da absorção de nutrientes, além de favorecer alguns grupos de micro-organismos (BUTAYE et al., 2003). É aceito que o uso de antimicrobianos via ração melhora a eficiência alimentar por reduzir a carga bacteriana entérica, diminuindo, assim, a energia consumida; esta energia disponível é utilizada no crescimento do animal (HARDY, 2002). Entretanto, não há apenas benefícios no uso dos aditivos zootécnicos. Um exemplo do efeito negativo é o aumento da frequência de doenças, pois com a eliminação das bactérias comensais da microbiota intestinal, aumenta a chance de cepas patogênicas e resistentes aos antimicrobianos colonizarem o intestino (HILL et al., 2010).

O uso metafilático de antimicrobianos ocorre quando a administração é feita em animais doentes e naqueles em contato com esses, assim que os primeiros sinais de alguma enfermidade são detectados no rebanho. Assim, é permitido um primeiro contato do animal com a bactéria, estimulando o sistema imune, mas é aplicado o antimicrobiano antes que ocorram sinais de infecção ativa (BARCELLOS et al., 2009). Neste caso, não é utilizada subdosagem do princípio ativo (KARRIKER et al., 2012).

A medicação na forma profilática, ou preventiva, é utilizada de forma individual ou no grupo antes que a doença ocorra. De acordo com a probabilidade de ocorrer uma doença específica em uma determinada faixa etária, é aplicada uma medicação em dosagem terapêutica, por um período curto, de forma que previna a infecção (BARCELLOS et al., 2009; KARRIKER et al., 2012). Geralmente, a administração profilática é realizada em forma de pulsos de adição de antimicrobianos na ração, principalmente nas etapas de maior estresse

para os animais, como o período pós-desmame, troca de alojamento e contato com animais de origens diferentes.

O uso terapêutico ocorre no tratamento dos animais doentes, após o diagnóstico do médico veterinário e, de preferência, após a realização de teste de susceptibilidade antimicrobiana do agente etiológico, como forma de garantir a eficiência terapêutica e prevenir casos de resistência antimicrobiana. Para escolha da droga a ser utilizada, deve-se levar em consideração, também, o espectro de ação, a farmacocinética, reações adversas e a autorização de uso na suinocultura. Deve-se sempre avaliar os resultados obtidos com o tratamento, e quando necessário, mudar o protocolo (KARRIKER et al., 2012).

Dentre todas as formas de uso de antimicrobianos, o aspecto que mais tem sido questionado é o emprego de subdosagens ou, até mesmo, dosagens terapêuticas de forma profilática na produção animal. O uso desses medicamentos aumenta a chance de seleção de cepas resistentes, propiciando o surgimento de cepas multirresistentes (GUARDABASSI et al., 2010; SCHWARZ et al., 2010). Nos Estados Unidos, não é restringido o uso de antimicrobianos de nenhuma forma, porém recomenda-se seu uso de forma prudente. As bactérias que têm sido monitoradas para basear as decisões são: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Enterococcus*. Com base nos resultados obtidos poderá haver informações suficientes para promover a suspensão do uso de um determinado antimicrobiano, caso que ocorreu com o uso de fluoroquinolonas em frangos (TURNIDGE, 2004). Os mesmos dados fornecem base para auxiliar na aprovação de medicamentos eficazes e seguros para os animais.

Já outros países optaram por proibir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, como foi o caso da União Europeia (Regulamento CE nº 1831/2003). Essa medida levou à drástica redução na quantidade total de antimicrobianos administrados aos animais; entretanto, resultou em aumento no uso de antimicrobianos para fins terapêuticos (BUROW et al., 2014). A proibição total tem sido questionada, pois os resultados zootécnicos, obtidos após 2006 na UE, não têm sido positivos. Houve um aumento na ocorrência de doenças, enquanto a eficiência da produção diminuiu. Em resposta a isso, estratégias que visam estimular as defesas naturais do hospedeiro, por meio do uso de substâncias capazes de modular funções imunes, plasma spray-dried, derivados de levedura, extratos de plantas e prébióticos, têm sido estudadas como alternativas para substituir o uso de antimicrobianos (GALLOIS et al., 2009; ALLEN et al., 2013; ALLEN et al., 2014).

Novos conceitos, como os esforços para erradicação de isolados resistentes, também têm sido avaliados. Na Alemanha, medidas de descontaminação foram utilizadas

experimentalmente numa granja para eliminar cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL). O processo de descontaminação eliminou as cepas de MRSA e ESBL, e incluiu a remoção completa dos suínos, limpeza e desinfecção das baias, e melhorias de qualidade no manejo. Após 12 meses desse processo, isolados ESBL positivos não foram mais encontrados; entretanto, outras cepas MRSA, introduzidas a partir de outras origens, foram isoladas a partir de suínos e do ambiente. Concluiu-se que os protocolos de descontaminação podem ser bem-sucedidos, no entanto não impedem a introdução de novas cepas, sendo necessário monitoramento constante (SCHMITHAUSEN et al., 2015).

2.2 Resistência aos antimicrobianos

Os micro-organismos podem apresentar capacidade de resistir aos efeitos dos antimicrobianos. Existem várias definições de resistência, baseadas em diferentes critérios, sendo as mais utilizadas a microbiológica e a clínica. Segundo o critério microbiológico, um isolado é considerado resistente quando consegue se multiplicar *in vitro* na presença de concentrações do antimicrobiano maiores do que o ponto de corte estabelecido para cepas filogeneticamente relacionadas. Do ponto de vista clínico (*in vivo*), uma cepa é considerada resistente quando a terapia antimicrobiana instituída não resulta na sua eliminação. Nesse caso, a resistência ao tratamento inclui outros fatores determinantes como: o sítio da infecção, a dosagem do antimicrobiano, o tempo de tratamento e o estado imunológico do hospedeiro (GUARDABASSI e COURVALIN, 2006; BLAHA, 2011).

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 (SCHWARZ et al., 2006). A partir do surgimento desse isolado resistente, populações bacterianas inicialmente susceptíveis a determinado antimicrobiano podem tornar-se resistentes, geralmente após seleção resultante do uso do princípio ativo.

As bactérias podem se tornar resistentes aos antimicrobianos através de vários mecanismos (TENOVER, 2006; ALEKSHUN e LEVY, 2007; VAN HOEK et al., 2011):

- i. alterações da permeabilidade da parede celular bacteriana, que restringe o acesso aos antimicrobianos nos locais alvo;

- ii. bomba de efluxo;
- iii. modificação enzimática da molécula antimicrobiana;
- iv. degradação do agente antimicrobiano;
- v. aquisição de vias metabólicas alternativas às inibida pelo fármaco;
- vi. alteração dos alvos de antimicrobianos;
- vii. superprodução da enzima alvo.

A aquisição horizontal de genes a partir de outras bactérias ocorre por mecanismos como a conjugação, transdução e transformação. A conjugação é mediada por plasmídeos, conjugativos ou mobilizáveis, transferidos entre duas células que se encontram ligadas por uma fímbria específica denominada *pilus*. Isto permite que a cópia de um determinado plasmídeo de resistência seja transferida de uma bactéria resistente para outra suscetível. Na transdução, porções do DNA são transferidas de uma bactéria a outra, carregada por um vírus bacteriano (bacteriófagos ou fagos). Já na transformação, ocorre a transferência de fragmentos de DNA livre incorporados por uma bactéria receptora. As porções de DNA transferidas podem ser incorporadas ao genoma da célula receptora por meio de recombinação. Eventualmente essas sequências de DNA compreendem genes de resistência aos antimicrobianos, que serão incorporados ao genoma da célula receptora (TENOVER, 2006; MADIGAN et al., 2010).

As mutações são outra forma de aquisição de resistência, podendo levar à alteração do sítio de ligação do agente antimicrobiano, hiper-regular a produção de enzimas que inativam o princípio ativo do fármaco e, até mesmo, alterar proteína de transporte da membrana externa (TENOVER, 2006; ALEKSHUN e LEVY, 2007).

Os isolados bacterianos que carregam tanto modificações genômicas devido às mutações, quanto pela aquisição de genes que conferem resistências, são selecionadas pelo uso do antimicrobiano alvo da resistência adquirida. Quando a resistência ocorre devido à mutação cromossômica e seleção, é denominada evolução vertical; já aquela que ocorre através da aquisição de material genético de outra bactéria é denominada evolução horizontal, podendo ocorrer até mesmo entre diferentes espécies ou gêneros.

2.2.1 Mecanismo de resistência às principais classes de antimicrobianos

a) Resistência a β -lactâmicos

Os β -lactâmicos constituem um grupo de fármacos com presença de um grupamento químico denominado anel β -lactâmico. Pertencem a este grupo as penicilinas – primeiro antibiótico, descoberto em 1929, cefalosporinas, cefamixinas, oxicefamixinas, carbapemênicos, ácido clavulânico, sulbactam e os monobactâmicos (VAN HOEK et al., 2011). São utilizados no tratamento de diversas infecções causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária. O mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação às enzimas PBPs (proteínas ligantes de penicilina), interferindo com a ligação cruzada do peptidoglicano que compõem a parede bacteriana. Com isso, há perda da rigidez da parede, levando à lise osmótica (VAN HOEK et al., 2011). Seu uso em animais no Brasil é liberado (BRASIL, 2010), entretanto os β -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas) são exclusivamente de uso terapêutico, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos ou como conservante de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

O primeiro relato de resistência antimicrobiana nesta classe ocorreu em 1940, quando foi detectada a enzima β -lactamase AmpC em *Escherichia coli*; desde então a resistência contra essas moléculas tem sido relatada de forma crescente. Existem vários mecanismos de resistência já descritos (SCHWARZ et al., 2006; VAN HOEK et al., 2011). Em bactérias Gram-negativas o principal mecanismo relaciona-se à inativação do antimicrobiano por β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As β -lactamases têm sido classificadas segundo os esquemas de Ambler ou de Bush-Jacoby-Medeiros. Segundo a classificação de Ambler, as enzimas são divididas em quatro grandes classes (A a D), com base na homologia proteica. A classe A corresponde às penicilinases, a B às metalo- β -lactamases, a C às cefalosporinases e a D às oxacilinases. Já a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as β -lactamases de acordo com as semelhanças funcionais. Existem quatro grupos principais e vários subgrupos (BUSH et al., 1995; BABIC et al., 2006).

Destacam-se nos últimos anos as β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), as quais conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, mas são inibidas por ácido clavulânico. São incluídas nas classes A e D de Ambler, e nos grupos 2be ou 2d de

Bush-Jacoby-Medeiros, e podem ser classificadas em diversas famílias, como TEM, SHV, OXA, CTX-M, PER, CARB- e VEB (BRADFORD, 2001).

As primeiras ESBLs identificadas foram derivadas de genes *bla* que codificam enzimas TEM-1 e SHV-1, variantes predominantes durante as décadas de 80 e 90, e encontradas principalmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* causadora de infecções nosocomiais (PATERSON e BONOMO, 2005). Os genes correspondentes foram muitas vezes localizados em plasmídeos, facilitando sua propagação (LIEBANA et al., 2013). Entre as β -lactamases do tipo TEM, aquelas codificadas pelos genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-135}, pertencem a classe 2b e codificam as penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. Já outros genes, como *bla*_{TEM-3}, *bla*_{TEM-4}, *bla*_{TEM-20}, *bla*_{TEM-25}, *bla*_{TEM-27}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{TEM-63}, *bla*_{TEM-131}, *bla*_{TEM-144}, *bla*_{TEM-149} e *bla*_{TEM-188} codificam β -lactamases de espectro ampliado e pertencem à classe 2be.

Durante a última década, têm sido observadas ESBLs derivadas de enzimas do tipo CTX-M, que incluem pelo menos seis grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC (CANTÓN et al., 2012; D'ANDREA et al., 2013; SCHINK et al., 2013), sendo consideradas as mais prevalentes em *Enterobacteriaceae*. Mais de 150 variantes do grupo CTX-M já foram descritas. Os genes *bla*_{CTX-M} encontrados em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* são geralmente localizados em grandes plasmídeos conjugativos (ZHAO e HU, 2013), embora em algumas cepas tenham sido encontrados no DNA cromossômico (MAHROUKI et al., 2012). Em monitoramento realizado pela Alemanha com isolados de *E. coli* provenientes de animais, foram descritos os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-52}, sendo todos os genes carregados por plasmídeos (SCHINK et al., 2013).

Já as β -lactamases do tipo AmpC são cefalosporinas codificadas por genes cromossômicos ou, em genes plasmidiais em muitas bactérias Gram-negativas (LIEBANA et al., 2013). Conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, podendo hidrolisar cefamicinas (cefotaxima), oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonam); entretanto não têm ação sobre cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos (LIEBANA et al., 2013). Em contraste com ESBLs, β -lactamases do tipo AmpC não são inibidas pelo ácido clavulânico. A resistência às cefalosporinas ocorre devido às mutações no promotor ou atenuador do gene, resultando em super-expressão da enzima. As bactérias que não possuem o gene cromossômico 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. Muitas dessas enzimas já foram encontradas em isolados da família *Enterobacteriaceae* provenientes de animais de produção e alimentos. O gene *bla_{CMY-2}* é considerado o mais comum (BEN SALLEM et al., 2012; LIEBANA et al., 2013).

b) Resistência à aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos caracterizados pela presença de um anel aminociclitol ligado aos aminoaçúcares de sua estrutura. A primeira molécula, estreptomicina, foi descoberta em 1940, em *Streptomyces griseus*. Após, outras moléculas foram sendo caracterizadas, não só a partir de espécies de *Streptomyces*, mas também de *Micrononospora*, além de derivados semissintéticos. Aminoglicosídeos apresentam largo espectro antimicrobiano, além de apresentarem sinergismo com diversas classes. Como exemplos destas drogas, podemos citar a estreptomicina, canamicina, gentamicina, tobramicina e amicacina. Sua atividade bactericida ocorre pela ligação aos ribossomos (fração 30S), impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e a síntese proteica correspondente (BECKER e COOPER, 2013).

Vários mecanismos de resistência já foram descritos, como: *i.* sistemas de efluxo; *ii.* mutações ribossômicas; *iii.* diminuição da permeabilidade; e, *iv.* inativação da droga por enzimas modificadoras. A presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos é considerada o principal mecanismo de resistência. Estas proteínas são classificadas em três grandes classes, de acordo com o tipo de modificação: AAC (acetiltransferases), ANT (adeniltransferases ou nucleotidiltransferases), APH (fosfotransferases) (VAN HOEK et al., 2011; BECKER e COOPER, 2013). A maioria dos genes codificadores dessas enzimas já foi identificada em bactérias Gram-negativas e encontra-se em plasmídeos ou transposons podendo conferir resistência à diversos antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2006; BYARUGABA, 2010).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos podem ser nomeadas a partir de dois sistemas: (I) de acordo com ação enzimática – utilizam-se as três letras (AAC, ANT, APH), seguidas de um número entre parênteses que identifica o sítio de modificação e, logo após, um numeral romano para designar a subclasse ou subtipo; (II) de acordo com o gene codificador – utilizam-se as três letras minúsculas em itálico para cada tipo de atividade (*aac*, *aad*, *aph*), uma letra maiúscula para identificar o sítio da modificação e um número para o subtipo do gene (SCHWARZ et al., 2006).

Atualmente existem quatro classes de enzimas AACs: AAC(1); AAC(3)-I a X; AAC(2')-I e AAC(6')-I a IV. As enzimas do tipo aminoglicosídeo fosfotransferases (APH), codificadas pelos genes *aph*, são responsáveis pela fosforilação de grupamentos hidroxila em aminoglicosídeos, resultando em alteração na capacidade de ligação aos ribossomos. Sete classes são descritas dessas enzimas: APH(2'')-I a IV, APH(3')-I a VII, APH(3'')-I, APH(4)-I, APH(6)-I, APH(7'')-I e APH(9)-I. Já as enzimas aminoglicosídeo adeniltransferases (AAD ou ANT) apresentam-se divididas em cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) e ANT(9); conferem resistência à tobramicina, amicacina e gentamicina (BECKER e COOPER, 2013).

c) Resistência às tetraciclinas

A primeira molécula desta classe foi caracterizada em 1948. A partir desse período, foram identificadas novas tetraciclinas principalmente em espécies de *Streptomyces*. Estas moléculas são antimicrobianos de amplo espectro, bacteriostáticos, incluindo as tetraciclinas, oxitetraciclinas, clortetracilinas, doxiciclinas e minociclinas. Estes antimicrobianos inibem a síntese proteica de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por ligarem à subunidade 30S do ribossomo bacteriano (THAKER et al., 2010). Seu uso em medicina veterinária é proibido como aditivo zootécnico ou como conservante de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Até meados de 1950, a maioria das bactérias comensais e patogênicas eram sensíveis à tetraciclina. No entanto, a partir de 1953 isolados resistentes a essa classe foram surgindo. Três mecanismos para a resistência às tetraciclinas são descritos: *i.* proteínas de proteção ribossomal, *ii.* inativação enzimática, e, *iii.* bombas de efluxo, sendo o último, o mecanismo mais comumente observado. O efluxo da droga ocorre através de uma proteína de exportação MFS (major facilitator superfamily). Estas proteínas, localizadas na membrana citoplasmática da bactéria, são codificadas pelo gene *tet*. Sua ação ocorre pelo bombeamento do antimicrobiano, logo após seu ingresso no citoplasma bacteriano, fazendo com que a concentração intracelular da droga não seja suficiente para ser efetiva (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

As proteínas de efluxo para tetraciclinas apresentam aminoácidos e estrutura proteica semelhante às bombas de efluxo responsáveis pela resistência a outros princípios ativos, como amônia quaternária, cloranfenicol e quinolona, podendo levar à multirresistência. Há mais de 40 genes *tet* descritos, sendo que em bactérias Gram-negativas, estes genes geralmente estão localizados em grandes plasmídeos, os quais estão amplamente distribuídos na população

bacteriana. Como estes plasmídeos geralmente carregam outros genes de resistência, a seleção de qualquer gene presente co-seleciona a resistência à tetraciclina. Esse fato justifica a elevada prevalência de resistência à tetraciclina encontrada na literatura (NG et al., 2001).

d) Resistência aos fenicóis

O cloranfenicol foi isolado de *Streptomyces venezuelae* em 1947. Por apresentar uma molécula com estrutura bastante simples, é um grupo que apresenta um número pequeno de derivados sintéticos (VAN HOEK et al., 2011). São considerados bacteriostáticos, pois se ligam à fração 50S do ribossomo bacteriano, competindo com o mRNA e impedindo a síntese proteica. O espectro de ação inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias. O uso de cloranfenicol em animais de produção é proibido no Brasil (BRASIL, 2003), entretanto o uso de florfenicol de forma terapêutica e profilática é liberado e muito utilizado na suinocultura.

A resistência ao cloranfenicol é geralmente devido à inativação através da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CATs), tipos A e B. As CATs promovem acetilação da molécula de cloranfenicol, originando um derivado que não consegue interagir com os ribossomos bacterianos (KEHRENBURG et al., 2005). O florfenicol, derivado do cloranfenicol, é resistente à inativação pelas enzimas CAT, pois houve uma substituição do grupo hidroxílico no carbono 3 por um átomo de flúor. Assim, o sítio de acetilação inexistente; conseqüentemente, as cepas resistentes ao cloranfenicol são susceptíveis ao florfenicol (SCHWARZ et al., 2006; BYARUGABA, 2010). Adicionalmente, a resistência aos fenicóis pode estar associada com a aquisição e expressão de proteínas de efluxo, principalmente em bactérias Gram-negativas (VAN HOEK et al., 2011).

Os genes *cat* codificam CATs, sendo o gene *catA1* o mais frequente, muitas vezes localizados em plasmídeos. O mecanismo de bomba de efluxo é codificado por genes *clmA* e *floR*. A expressão do gene *clmA* resulta em resistência ao cloranfenicol, mas não ao florfenicol. A expressão do gene *floR* resulta no efluxo, tanto de cloranfenicol quanto florfenicol (VAN HOEK et al., 2011).

e) Resistência às sulfonamidas

As sulfonamidas pertencem às mais antigas drogas sintéticas, tendo sido utilizadas pela primeira vez em 1932. São quimioterápicos derivados da sulfanilamida, que se

caracterizam por conter moléculas de enxofre e grupamentos amina na molécula. As sulfonamidas são análogas do ácido para-aminobenzóico (PABA) e inibem a síntese do ácido fólico por competição com o substrato natural do ácido p-amino-benzoico para a ligação da enzima diidropteroato sintase (DHPS), envolvida na síntese do ácido fólico (VAN HOEK et al., 2011). Seu uso no Brasil como aditivo zootécnico é proibido (BRASIL, 2009), entretanto seu uso terapêutico é permitido, sendo geralmente utilizado em associação com a trimetoprima.

A resistência bacteriana às sulfonamidas é atribuída à presença de DHPS alterada, ou seja, por meio de mutações no gene DHPS (*folP*) ou através da aquisição de um gene DHPS alterado (*sul*), cujo produto tem baixa afinidade com sulfonamidas. Este último mecanismo de resistência é o mais prevalente, e já foram identificados genes *sul1*, *sul2* e *sul3*.

O gene *sul1* é frequentemente encontrado no segmento conservado 3' (3'-CS) do integron classe 1 e associado a outros genes de resistência, enquanto que o gene *sul2* está localizado em pequenos ou grandes plasmídeos não conjugativos (SCHWARZ et al., 2006; BYARUGABA, 2010).

f) Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas

Em 1962, durante o processo de síntese e purificação de cloroquina – agente anti-malária, foi descoberto o primeiro derivado de quinolona, ácido nalidíxico, que apresentou ação bactericida contra bactérias Gram-negativas. Após alteração da molécula através da adição de um átomo de flúor, surgiram as fluoroquinolonas. Essas apresentam uma ação antimicrobiana mais potente e um maior espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e também algumas espécies Gram-positivas (VAN HOEK et al., 2011). Atualmente, existem quatro gerações de quinolonas/fluoroquinolonas em uso clínico (Tabela 1). No Brasil, é vedado o uso dessas moléculas como aditivos promotores de crescimento ou conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009), porém são drogas amplamente utilizadas na terapêutica de diversas infecções que acometem suínos (BARCELLOS et al., 2009).

Essas moléculas agem nas bactérias inibindo a ação das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, impedindo, assim, a replicação do DNA bacteriano (SCHWARZ et al., 2006; BYARUGABA, 2010). Tanto a DNA girase, quanto a topoisomerase IV, são compostas por duas subunidades, a GyrA e GyrB, e ParC e ParE, respectivamente.

Tabela 1. Quinolonas e fluoroquinolonas existentes

Geração	Molécula/Droga
Primeira geração	Ácido nalidíxico
Segunda geração	Ciprofloxacina
	Enrofloxacin
	Norfloxacin
	Levofloxacin
Terceira geração	Sparfloxacin
	Gatifloxacin
	Grepafloxacin
Quarta geração	Trovafloxacin
	Moxifloxacin
	Gemifloxacin

*Adaptada: Redgrave et al., 2014.

Essas moléculas agem nas bactérias inibindo a ação das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, impedindo, assim, a replicação do DNA bacteriano (SCHWARZ et al., 2006; BYARUGABA, 2010). Tanto a DNA girase, quanto a topoisomerase IV, são compostas por duas subunidades, a GyrA e GyrB, e ParC e ParE, respectivamente.

A resistência a essa classe relaciona-se com mutações de um ou mais genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*) que codificam os alvos primários e secundários destes medicamentos. Em *E. coli* a maioria das mutações ocorre em uma pequena porção do principal alvo de ação das quinolonas, o gene *gyrA*. A região onde a mutação ocorre é denominada região determinante de resistência às quinolonas (*Quinolone Resistance Determinant Region - QRDR*) (STRAHILEVITZ et al., 2009). A resistência ocorre gradualmente e de maneira acumulativa, ou seja, mutações simples no sítio principal de ação da droga são associadas a moderados graus de resistência, enquanto mutações adicionais no sítio primário e/ou secundário levam a alto grau de resistência. Outro mecanismo de resistência está relacionado à alteração na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC, em virtude de mutações nos genes reguladores, resultando em super-expressão de sistemas de efluxo (SCHWARZ et al., 2006).

O primeiro gene de resistência à quinolona mediada por plasmídeo identificado foi o *qnr*. Cinco famílias de genes *qnr* já foram relatados: *qnrA* (7), *qnrB* (39), *qnrC* (1), *qnrD* (1), e *qnrS* (4), sendo que o número entre parênteses indica a variante conhecidas de cada tipo.

Vários genes que codificam diferentes mecanismos de resistência e de elementos genéticos móveis podem diminuir a susceptibilidade à quinolonas ou fluoroquinolonas; estes são frequentemente codificados em plasmídeos e conhecidos como plasmídeos mediadores de resistência a quinolona (PMQR). De acordo com o gene encontrado, o valor da concentração inibitória mínima (CIM) é alterado. Estas mudanças de CIM são atribuídas às diferenças no número de cópias do plasmídeo e expressão do gene em questão (REDGRAVE et al., 2014). Outro mecanismo relatado é o *qepA*, uma bomba de efluxo mediado por genes plasmídeos. Uma variante, *qepA2* foi identificado em *Escherichia coli* na França (CATTOIR et al., 2008).

2.3 Ocorrência de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli*

A prevalência e disseminação crescente da resistência antimicrobiana é resultado, da seleção natural, através da pressão seletiva. Em qualquer população bacteriana podem existir bactérias portadoras de genes que lhes conferem a característica de resistir à ação do agente antimicrobiano. Após o uso desse antimicrobiano, micro-organismos sensíveis serão eliminados, persistindo as cepas resistentes. O uso contínuo de antimicrobianos em um determinado ambiente contribui para que a comunidade bacteriana mude, com uma proporção cada vez maior de micro-organismos resistentes.

O uso intensivo de antimicrobianos, tanto em medicina humana, quanto veterinária, contribui para a seleção de bactérias que não respondem à terapia antimicrobiana (SCHWARZ e CHASLUS-DANCLA, 2001; ECDC/EFSA/EMA, 2015). A pressão seletiva do uso de antimicrobianos na produção animal é, em parte, responsável pela persistência de genes de resistência encontrados na microbiota intestinal; entretanto, a resistência pode persistir mesmo sem administração de antimicrobianos. Essa persistência ocorre, pois muitos genes de resistência estão agrupados em elementos móveis, podendo ser transferidos e co-selecionados entre diferentes espécies através do mecanismo conhecido como transmissão horizontal de genes de resistência (SMETS e BARKAY, 2005; GUARDABASSI e COURVALIN, 2006; SCHWARZ et al., 2006).

Os genes de resistência, frequentemente, estão localizados em elementos móveis como plasmídeos, transposons e cassetes gênicos em integrons. Os plasmídeos são elementos genéticos que se replicam independentemente do cromossomo e podem ser transferidos entre bactérias pela conjugação. A sua presença não é essencial para a bactéria, entretanto pode conferir uma vantagem seletiva, desempenhando um papel importante na adaptação bacteriana (COUTURIER et al., 1988). Os transposons são elementos gênicos capazes de

movimentarem-se no cromossoma bacteriano, ou migrarem entre cromossoma e plasmídeo. Entretanto, não possuem sistemas de replicação, necessitando estar integrados no DNA cromossomal ou plasmídeos para manutenção. Podem ser conjugativos e não-conjugativos (SCHWARZ et al., 2013). Finalmente, os cassetes gênicos são pequenos elementos genéticos móveis, que consistem de um sítio de recombinação específico e um gene, geralmente de resistência. Esses elementos não possuem sistemas de replicação ou transposição, mas sofrem integração por recombinação sítio-específica catalisada por uma integrase codificada por genes que fazem parte dos chamados integrons. Integrons carregam diferentes cassetes gênicos e, por terem um promotor no segmento conservado 5', garantem a expressão desses genes. Integrons do tipo 2 carregam genes de transposição no segmento 3' conservado, ao passo que os integrons de tipo 1 não contam com esses genes, necessitando estar em transposons ou plasmídeos para serem móveis (SCHWARZ et al., 2006).

A identificação de perfis comuns de resistência aos antimicrobianos em espécies bacterianas isoladas de animais e humanos, tem tornado esse problema uma nova preocupação em saúde pública. Selecionando bactérias resistentes em animais, as mesmas podem ser transferidas para os humanos através dos alimentos ou água, causando infecções de difícil controle, ou transferindo genes de resistência dos micro-organismos de origem animal para os que colonizam humanos. Genes de resistência aos antimicrobianos já foram identificados também em bacteriófagos de fezes de animais, o que facilita a transferência de genes de resistência tanto para cepas potencialmente patogênicas para humanos quanto para animais (ALLEN et al., 2011).

Esta preocupação tem sido fundamentada em estudos, como o de Leverstein e colaboradores (2011) que determinaram a distribuição de genes de produção ESBL em cepas de *E. coli* isolados de carne de frango, comparando, posteriormente, com isolados clínicos de pacientes holandeses. Das amostras de carne de frango, 94% continham cepas produtoras de ESBL, dos quais 39% pertenciam à genótipos de *E. coli* também presentes em pacientes humanos. Entretanto, em estudo posterior houve baixo nível de bactérias ESBL positivas em humanos que trabalhavam diretamente com suínos, demonstrando que não houve transferência de bactérias ou genes de resistência para a microbiota nasal desses trabalhadores (FISCHER et al., 2016).

Em estudo realizado no Canadá, por Dutil e colaboradores (2010), foi encontrada uma forte correlação entre cepas de *Salmonella* Heidelberg resistentes ao ceftiofur (cefalosporina de amplo espectro) isoladas de frango e cepas resistentes desse mesmo sorovar isoladas de humanos. A resistência encontrada, tanto em *Salmonella*, quanto em *E. coli* parece

relacionada ao uso de ceftiofur em incubadoras de ovos, fornecendo evidências que o uso desta droga em frangos, resulta em aumento de bactérias ESBL positivas nos animais e nos humanos. O uso de cefalosporinas de terceira e quarta geração na produção de alimento animal pode ser uma razão importante para a ocorrência de bactérias produtoras de ESBL nos animais de produção. Entretanto, a análise de 1378 isolados de *E. coli* de diferentes animais para identificação de genes codificadores de ESBL, resultou em apenas 27 isolados positivos, sendo 13 provenientes de suínos (13/538 isolados de suínos) (SCHINK et al., 2013).

Na Índia, um estudo conduzido em 200 suínos saudáveis, encontrou apenas 6% colonizados por cepas de *E. coli* ESBL positivas, sendo que destas, seis isolados carregavam o gene *bla*_{CTX-M} e dez *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (SAMANTA et al., 2015). No Brasil, isolados de *E. coli* proveniente de humanos e alimentos foram suscetíveis à ceftriaxona, e apresentaram 26%, 20,2%, 15,4% e 6% de resistência frente à tetraciclina, ampicilina, sulfa+trimetoprima e cefalotina, respectivamente. Dentre os 31 isolados resistentes, 29 padrões de perfil clonal foram identificados (MELO et al., 2015). Apesar desse estudo não ter identificado isolados produtores de ESBL, mais pesquisas são necessárias para determinar a frequência de isolados ESBL circulantes em alimentos e animais no Brasil.

A identificação de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos em amostras colhidas de suínos é relatada em inúmeros estudos, em diferentes gêneros, como: *Campylobacter* (GEBREYES et al., 2005); *Salmonella* (GEBREYES et al., 2004; MURMANN et al., 2009; GUERRA et al., 2011; KICH et al., 2011; LOPES et al., 2015); e *Enterococcus* (CAMPOS et al., 2015). Em isolados de *E. coli*, experimento conduzido por Cavaco et al. (2008) forneceu evidências do efeito da administração de cefalosporinas na seleção e persistência de *E. coli* produtoras de ESBL na microbiota de suínos. O uso frequente de outras classes de antimicrobianos também pode ter efeito seletivo (DIKMEVIUS, 2011).

Estudos demonstram a ocorrência de resistência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos clinicamente saudáveis, assim como originadas de amostras ambientais, como apresentado por Costa e colaboradores (2010), que observaram resistência frente à gentamicina (71,4%), ampicilina, tetraciclina, amicacina e colistina (42,86% cada) em amostras de fezes de suínos saudáveis, bem como resistência à gentamicina e tetraciclina (60%) e neomicina (50%) em amostras de *E. coli* do ambiente.

Van den Bogaard e colaboradores (2000) encontraram prevalência elevada de isolados resistentes em *E. coli* provenientes de amostras fecais de suínos no pré-abate. Na Holanda, as maiores frequências de resistência ocorreram frente à amoxicilina (70-94%), oxitetraciclina (78-98%), trimetoprima (62-96%), cloranfenicol (55-67%) e neomicina (38-67%). A

percentagem de isolados de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas no Reino Unido aumentou de 6% para 20% entre 2001 e 2006, e manteve-se em torno de 17% até então (LIVERMORE, et al., 2013).

Em sistemas de armazenamento de dejetos suínos no sul do Brasil, apenas 6,25% dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Os demais foram resistentes frente a pelo menos um antimicrobiano, sendo 37,5% multirresistentes (SILVA et al., 2008). Schneider et al. (2009), determinaram o perfil de resistência antimicrobiana em 205 isolados de *E. coli* obtidos de águas subterrâneas e superficiais em região produtora de suínos no Estado do Rio Grande Sul, encontrando um percentual de 25,96% e 26,73% de multirresistentes em águas superficiais e subterrâneas, respectivamente. Apenas 19,23% e 13,86% dos isolados de água superficial e subterrânea, respectivamente, foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, sugerindo a disseminação de isolados resistentes no ambiente.

Em trabalho realizado por Wu e colaboradores (2009), foi determinada a prevalência de *E. coli* resistentes à tetraciclina em carcaças suínas, durante as etapas de abate (após sangria, escalda, divisão, resfriamento e após o corte), relatando que a prevalência de isolados resistentes à tetraciclina foram reduzidas em 8% até o pré-resfriamento. Para o princípio ativo sulfonamida foi encontrada prevalência de 18%, também em carcaças no pré-resfriamento (WU et al., 2010). A presença de resistência às quinolonas foi estudada em isolados de *Salmonella* e *Escherichia coli* proveniente de toda a cadeia de produção de suínos, aves, coelhos e bovinos. Uma alta frequência de resistência (54,8%) foi encontrada. Além disso, os genes de resistência foram associados à elementos genéticos móveis, sendo transferíveis entre gêneros diferentes e sendo potencialmente disseminadas através na cadeia alimentar, até os humanos (JONES-DIAS et al., 2013).

Em uma revisão sistemática, realizada por Burow e colaboradores (2014), sobre o uso de antimicrobianos via oral em relação à resistência antimicrobiana em *E. coli* de suínos, foi observado aumento de cepas resistentes após o uso de antimicrobianos pela via oral. Entretanto, os autores concluíram que mais estudos são necessários para elucidar o efeito de antimicrobianos administrados via oral em suínos, em relação à resistência antimicrobiana em *E. coli*. Conclusão semelhante foi publicada por Chantziaras e colaboradores (2014), após avaliarem a correlação entre o uso de antimicrobianos e a prevalência de resistência em isolados de *E. coli* de suínos, aves e bovinos.

Em regiões em que as práticas agrícolas levam ao menor uso de antimicrobianos, a taxa de resistência antimicrobiana pode ser menor, como demonstrado por Li e colaboradores

(2014), em que *E. coli* isoladas de fezes de suínos saudáveis apresentam 100% de suscetibilidade à amoxicilina e apenas 20% das cepas foram consideradas multirresistentes.

2.4 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal de mamíferos é composta por diversos grupos de micro-organismos, apresentando 10^{10} a 10^{12} células bacterianas por grama de conteúdo intestinal. A microbiota entérica desempenha um papel importante na saúde humana e animal. Em humanos, já foram encontradas pelo menos 1000 espécies (BÄCKHED et al., 2005; ALLEN et al., 2014), mas pode haver variação considerável entre indivíduos (ECKBURG et al., 2005). Em suínos, já foram descritos mais de 440 filos (LESER et al., 2002; SCHMIDT et al., 2011). Estes micro-organismos são de extrema importância para a manutenção da saúde do hospedeiro, pois exercem funções metabólicas e de proteção, como a defesa natural contra patógenos, através da modulação do sistema imunológico, e melhorando a utilização de nutrientes (HOOPER e GORDON, 2001; ZOETENDAL et al., 2004). Estudos com animais germ-free demonstram que as bactérias comensais também influem na expressão de genes do hospedeiro (HOOPER et al., 2001); portanto, o estudo da composição taxonômica e a capacidade funcional da microbiota é de grande importância para a compreensão dos papéis que desempenham na fisiologia do próprio animal (LAMENDELLA et al., 2011).

Composições diferentes na dieta podem alterar a microbiota intestinal do suíno. Estudos relatam que níveis diferentes de polissacarídeos não amiláceos (*non-starch polysaccharides* – NSP), aumentam a diversidade microbiana no intestino, assim como a quantidade e qualidade de proteínas em rações (THOMSON e FRIENDSHIP, 2012). O uso de prebióticos e probióticos tem sido objeto de vários estudos em relação à saúde do intestino e à prevenção de infecções entéricas (CALVEYRA et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2012). Prebióticos são ingredientes não solúveis extraídos da parede de *Saccharomyces cerevisiae* que estimulam de forma seletiva o desenvolvimento de grupos de micro-organismos, melhorando o perfil da microbiota intestinal (GAGGIÀ et al., 2010). Podem atingir seus efeitos benéficos de duas maneiras: podem ser fermentados por bactérias favoráveis, propiciando uma vantagem competitiva; ou, podem se ligar às bactérias patogênicas (THOMSON e FRIENDSHIP, 2012). Já os probióticos são constituídos de bactérias vivas adicionadas à ração, com o objetivo de reforçar ou restabelecer o equilíbrio entre os componentes da microbiota intestinal. Essas competem por nutrientes ou por sítios de adesão – exclusão competitiva –, além de produzir substâncias inibidoras, como as bacteriocinas, que

reduzem populações patogênicas (GILLOR et al., 2008). O uso de dietas líquidas fermentadas também tem influência na microbiota intestinal. O alimento líquido é fermentado por bactérias lácticas, reduzindo o pH e, conseqüentemente, resultando em menor sobrevivência de patógenos (HARDY, 2002; MISSOTTEN et al., 2010).

O uso de antimicrobianos em dose terapêutica, independentemente da localização da infecção alvo que se encontra, altera a microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais (RASHID et al., 2012). Essas alterações podem estar relacionadas com a densidade populacional e com a composição da microbiota, desencadeando vários efeitos, como a síndrome do intestino irritável, infecções por patógenos, seleção de reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e transferência horizontal de genes entre bactérias (ALLEN et al., 2014). Neste sentido, a possibilidade do desenvolvimento ou aquisição de resistência por bactérias da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e de animais, em decorrência do uso de antimicrobianos, é um problema microbiológico relevante.

Comparando o perfil da microbiota intestinal em indivíduos que utilizam diferentes antimicrobianos, é possível identificar grupos bacterianos de importância funcional e estudar melhor a sua relação com a classe antimicrobiana utilizada. Dethlefsen e colaboradores (2008) estudaram a microbiota intestinal de humanos, antes e após o uso de ciprofloxacina. O uso do medicamento reduziu o número de táxons. Após quatro semanas sem o uso do medicamento, a microbiota mudou novamente, assemelhando-se com o perfil do intestino pré-tratado, entretanto alguns táxons não foram identificados novamente.

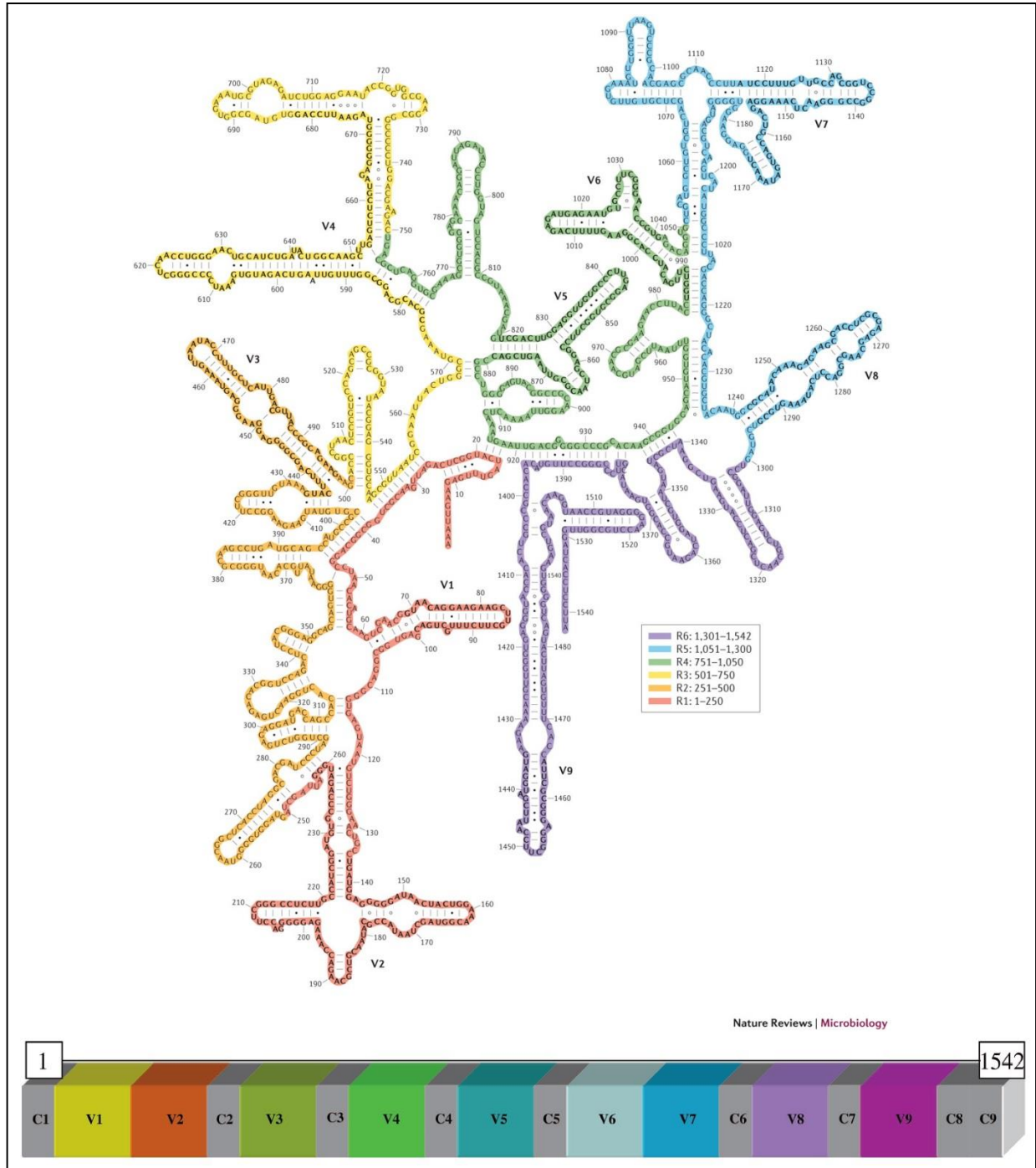
A perda de algumas bactérias comensais pode ter resultado negativo para o hospedeiro. Por exemplo, a eliminação da bactéria *Oxalobacter formigenes*, responsável pela degradação de oxalato em humanos, pode resultar em maior frequência de cálculos renais (DUNCAN et al., 2002). Em suínos que receberam ração com doses subterapêuticas de clorotetraciclina, sulfametazina e penicilina, foi demonstrado aumento na população de *E. coli* e redução de *Streptococcus* sp. (ALLEN et al., 2011; LOOFT et al., 2012). Além disso, houve aumento significativo na diversidade de genes codificadores de resistência, incluindo resistência a antimicrobianos que não haviam sido administrados (LOOFT et al., 2012). Estes genes encontravam-se em reservatórios denominados de *resistomes*, que podem contribuir para a preservação e expansão de determinantes de resistência, particularmente na presença da seleção de antimicrobianos (GARMENDIA et al., 2012). A diversidade de genes codificadores de resistência antimicrobiana já foram detectados em ecossistemas ambientais e intestinais (SOMMER et al., 2009; ALLEN et al., 2010), e estes podem persistir mesmo com a ausência do uso de antimicrobianos.

O conhecimento da maioria das bactérias do intestino ainda é limitado, já que foi resultante de técnicas baseadas em cultivo microbiano. Isso constitui um grande limitante nas pesquisas sobre microbiota intestinal, uma vez que a maioria dos micro-organismos presentes não são cultiváveis (LESER et al., 2002). A evolução para análises independentes de cultivo, que permitem acesso ao genoma de toda a comunidade microbiana de uma amostra (HANDELSMAN, 2004), possibilitou alcançar resultados que, com o método tradicional, não seriam possíveis. As técnicas como T-RFLP (*Terminal Restriction Frangment Length Polymorphism*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), LH-PCR (*Length Heterogeneity PCR*) diferenciam as comunidades através do padrão de bandas em gel do gene que codifica frações do ribossomo. Porém, é através de sequenciamento de alto rendimento de genes conservados, que é possível detalhar a comunidade microbiana presente no intestino, possibilitando também avaliar a capacidade funcional desta comunidade (GARMENDIA et al., 2012). Um estudo realizado em humanos demonstrou bem essa mudança de conceitos, pois 62% das bactérias identificadas eram anteriormente desconhecidas, e 80% delas foram considerados não cultiváveis (ECKBURG et al., 2005).

Com o surgimento de sequenciadores de nova geração, houve um aumento considerável em sequenciamento completo de genomas, pois permitiram maior rapidez e diminuição progressiva do custo do sequenciamento. A identificação da microbiota, por sua vez, pode ser efetuada por duas abordagens complementares, ambas utilizando os sequenciadores de nova geração: análise da distribuição das espécies; ou a análise da distribuição de genes. A primeira abordagem serve para compreender a dinâmica populacional dos micro-organismos presentes no ecossistema estudado. A segunda abordagem é necessária para a compreensão do metabolismo global da microbiota em questão.

O uso do gene que codifica o 16S rRNA é considerado padrão-ouro para a caracterização de comunidades microbianas. Este gene, em bactérias, consiste de sequências conservadas, intercaladas com sequências variáveis que incluem nove regiões hipervariáveis – V1-V9 (Figura 1). O tamanho das referidas regiões hipervariáveis pode compreender de 50 a 100 bases. Com dados da sequência do gene 16S rRNA, gêneros e espécies são distinguidos em níveis de 95% e 97% de identidade da sequência, respectivamente (PETROSINO et al., 2009). Diferentes regiões hipervariáveis apresentam diferente eficácia no que diz respeito à capacidade de diferenciação entre gêneros/espécies. As regiões V2 e V3 foram as mais eficazes para a identificação de gênero, em estudo realizado por Chakeavorty e colaboradores

(2007). Para estudar a microbiota intestinal de suínos, Looft e colaboradores (2012) sequenciaram a região V1-V3, a escolha da região V3 justificou-se por ter sido anteriormente considerada altamente informativa (BAKER et al., 2003).



Fonte: Pretosino et al., 2009.

Figura 1. Regiões conservadas (C1-C9) e regiões hipervariáveis (V1-V9) do gene 16S rRNA.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a resistência antimicrobiana em bactérias comensais do intestino de suínos.

3.2 Específico

- a) Avaliar a frequência de resistência antimicrobiana fenotípica e a presença de grupos clonais em *Escherichia coli* isoladas de fezes e carcaças suínas;
- b) Determinar o perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos em isolados multirresistentes de *E. coli* provenientes de carcaças de suínos e identificar grupos clonais presentes em carcaças suínas;
- c) Comparar o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração;
- d) Descrever o perfil da microbiota intestinal de suínos submetidos a diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo compreendeu três etapas descritas abaixo (4.1, 4.2 e 4.3). As etapas 1 e 2 foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS e a terceira etapa na Embrapa Suínos e Aves e no *National Animal Disease Center* – NADC/USDA.

4.1 ETAPA 1: Determinação do perfil de resistência fenotípica e perfil clonal entre isolados de *Escherichia coli* de fezes e carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento

4.1.1 Delineamento experimental e colheita de amostras

As amostragens foram conduzidas em três matadouros-frigoríficos localizados no Estado de Santa Catarina. Dois ciclos de colheita de amostras foram realizados em cada estabelecimento, acompanhando um turno de atividade, período em que foram abatidos entre 1.500 e 2.000 suínos. Em cada ciclo, três lotes de abate provenientes de granjas distintas foram amostrados. De cada lote foram colhidas duas sub-amostras: *i.* fezes dos animais alojados nas pocilgas de espera; *ii.* suabes de superfície de carcaças na etapa de pré-resfriamento.

Para colheita de fezes, o operador calçava, em ambos os pés, bota de plástico descartável e propé. A seguir, circulava em várias direções da pocilga de espera, cuidando para colocar em contato o propé com as fezes depositadas no piso. Em cada ciclo de amostragem, fezes de animais alojados em três pocilgas de espera distintas foram colhidas, totalizando 18 amostras de fezes. Após a colheita da amostra, os propés foram acondicionados em sacos estéreis com 40 mL água peptonada 0,1%, e a bota plástica descartada. Para a amostragem de superfície de carcaça, de cada lote incluído no estudo foi colhida amostra da quinta carcaça na nória, sendo as demais treze carcaças amostradas em intervalo de 20 carcaças. A colheita de amostra foi realizada por meio de esponjas individuais estéreis (Nasco®), previamente umedecidas em 10 mL de água peptonada 0,1% estéril. Esponjas foram friccionadas em quatro diferentes áreas de 100 cm² (lombo, papada, barriga e pernil), delimitada por molde estéril, totalizando 400 cm² de área amostrada por carcaça, de acordo com a Circular nº 130/2007/CGPE/DIPOA (BRASIL, 2007). A seguir, as quatro esponjas colhidas foram acondicionadas, em um único saco plástico, constituindo a amostra que representava a carcaça, e mantida sob refrigeração até a análise.

4.1.2 Formação do grupo de isolados de *Escherichia coli* proveniente de fezes e carcaças

As amostras de fezes e os suabes de carcaça foram adicionadas de 40 mL de água peptonada tamponada (APT) 0,1%, e homogeneizadas. Alíquotas das amostras foram semeadas em ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA, Oxoid) e incubadas (35°C±2; 24 h). Colônias típicas de coliformes foram transferidas, individualmente, para ágar MacConkey (Oxoid) e submetidas aos testes confirmatórios para *Escherichia coli* de acordo com Quinn et al. (2011). Após confirmação, foram formados dois grupos de isolados de *E. coli*: *i.* originados de fezes (n=355); *ii.* originados de carcaça (n=319). Em cada um dos grupos, foi garantido que isolados provenientes dos três matadouros-frigoríficos fossem incluídos em proporções semelhantes. Os grupos de isolados foram mantidos em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) acrescidos de 20% de glicerol e congelados à -20°C até as análises.

4.1.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*

Os isolados de *E. coli* foram testados quanto à resistência frente à antimicrobianos, pelo teste de difusão em ágar Muller–Hinton (Oxoid), realizado e interpretado de acordo com as normas dos documentos M31-A3 e M100-S22 (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Discos (Oxoid) de oito antimicrobianos foram testados, representando classes de princípios ativos utilizados na suinocultura: ácido nalidíxico (30 µg); ampicilina (10 µg); cefotaxima (30 µg); ceftazidima (30 µg); florfenicol (30 µg); gentamicina (10 µg); sulfonamidas (300 µg) e tetraciclina (30 µg). Para controle de qualidade do teste, foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram fenótipo de resistência a no mínimo três antimicrobianos de classes distintas, como recomendado por Schwarz et al. (2010).

As frequências de resistência aos antimicrobianos foram comparados através do teste não-paramétrico qui-quadrado (χ^2) pelo programa estatístico SPSS versão 23.0.0.2, com nível de confiança de 95%.

4.1.4 Macro restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A análise de macro restrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado – *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) foi conduzida de acordo com o protocolo

recomendado pelo PulseNet (CDC, 2013), utilizando a enzima de restrição *XbaI* (Fermentas) para a digestão. A eletroforese foi realizada em gel agarose 1% utilizando tampão 0,5X Tris-borato-EDTA no sistema CHEF DR-II (BioRad Laboratories), seguindo as condições de tempo inicial 6,76 segundos, tempo final 35,38 segundos e tempo de corrida de 21 horas à 14°C. Como referência de tamanho de fragmentos gerados foi utilizada a cepa de *Salmonella* Braenderup (ATCC BAA-664). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (2µg/mL, Sigma), fotografado em transiluminador e imagem capturada e digitalizada pelo sistema Kodak gel logic 2200 (Rochester). Os pulsotipos foram analisados pelo coeficiente de similaridade de Dice, com 1,7% de otimização e tolerância. Os perfis foram agrupados por UPGMA para construção de dendrogramas no software GelCompar II (Applied Maths). Isolados apresentando pulsotipos com similaridade $\geq 70\%$ foram considerados relacionados (TENOVER et al., 1995).

4.2 ETAPA 2: Determinação do perfil de genes de resistência em *Escherichia coli* provenientes de carcaça suínas na fase de pré-resfriamento

4.2.1 Isolados selecionados e determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos adicionais

Os isolados de *Escherichia coli* provenientes das carcaças suínas analisadas no item 4.1.1 e que apresentaram perfil fenotípico multirresistente foram selecionados para esta etapa.

O grupo de isolados selecionados foi testado quanto à resistência frente à dez antimicrobianos adicionais: amicacina (30 µg); canamicina (30 µg); cloranfenicol (30 µg); ertapenem (10 µg); estreptomicina (10 µg); fosfomicina (200 µg); netilmicina (30 µg); nitrofurantoina (300 µg); tobramicina (10 µg); e trimetoprima (5 µg). O teste de difusão em ágar foi realizado e interpretado de acordo com as normas dos documentos M31-A3 e M100-S22 (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Adicionalmente, a concentração inibitória mínima (CIM) frente à ciprofloxacina, foi determinada pelo teste de diluição em ágar, de acordo com as orientações do documento M7-A6 do CLSI (2003) em isolados resistentes ao ácido nalidíxico.

Os isolados que foram positivos ao teste de triagem para produtores de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL), ou seja, resistentes à cefotaxima e/ou ceftazidima no teste de

disco difusão, foram submetidos ao teste fenotípico confirmatório de ESBL com disco combinado dos mesmos princípios ativos com ácido clavulânico (CLSI, 2012).

4.2.2 Pesquisa de genes de resistência em isolados de *Escherichia coli* multirresistentes e determinação de perfil de PFGE

Trinta isolados de carcaça, entre os testados em 4.2.1, foram selecionados para pesquisa de genes de resistência, de acordo com os critérios: (1) maior número de marcadores fenotípicos de resistência concomitantes e/ou que apresentarem fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos; ou (2) cepas positivas ao teste de confirmação para produtores de ESBL.

O DNA total foi extraído conforme sistema de purificação Nucleospin Rissue 50r (Macherey Nagel), e os fragmentos foram amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de interesse (Tabela 2). Os *primers* e as condições de amplificação foram adaptados de estudos já publicados e utilizado controle positivo e negativo para cada reação. Os genes foram analisados por estatística descritiva quanto à frequência percentual de ocorrência no grupo de isolados.

Os mesmos isolados foram submetidos à análise de macro restrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado – *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) para identificação de grupos clonais, conforme o item 4.1.3.

Tabela 2. Genes codificadores de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli*, oligonucleotídeos iniciadores, condições de amplificação e fragmento esperado na PCR.

Classe Antimicrobiana	Gene de resistência	Amplicon (pb)	Primers (5' – 3')	Referência
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	953	fw: GTAATTCTGAGCACTGT rv: CCTGGACAACATTGCTT	Frech e Schwarz, 2000
	<i>tet(B)</i>	1169	fw: ACGTACTCGATGCCAT rv: AGCACTTGTCTCCTGTT	Frech e Schwarz, 2000
	<i>tet(G)</i>	1141	fw: CTGCTGATCGTGGGTCT rv: TTGCGAATGGTCTGCGT	Frech e Schwarz, 2000
Fenicóis	<i>catA1</i>	551	fw: GGCATTTTCAGTCAGTTG rv: CATTAAGCATTCTGCCG	Kikvi et al., 2007
	<i>floR</i>	1291	fw: AGGGTTGATTCGTCATGACCA rv: CGGTTAGACGACTGGCGACT	Kadlec et al., 2007
Aminoglicosídeos	<i>aac(3)IVa</i>	627	fw: GTGTGCTGCTGGTCCACAGC rv: AGTTGACCCAGGGCTGTCCG	Jensen, et al., 2006
	<i>aph(3)Ia</i>	669	fw: AACGTCTTGCTCGAGGCCGCG rv: GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGC	Jensen, et al., 2006

	<i>ant(2)Ia</i>	328	fw: GGGCGCGTCATGGAGGAGTT rv: TATCGCGACCTGAAAGCGGC	Jensen, et al., 2006
	<i>strA</i>	645	fw: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG rv: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	Kehrenberg e Schwarz, 2001
	<i>strB</i>	510	fw: ATCGTCAAGGGATTGAAACC rv: GGATCGTAGAACATATTGGC	Kikuvi et al., 2007
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	839	fw: ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGA rv: CTAGGCATGATCTAACCCCTCGGTCT	Grape et al., 2003
	<i>sul2</i>	703	fw: ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC rv: CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	Kehrenberg e Schwarz, 2001
	<i>sul3</i>	803	fw: GAGCAAGATTTTTTGAATCG rv: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGG	Grape et al., 2003
β-lactâmicos	<i>bla_{TEM}</i>	851	fw: ATGAGTATTCAACATTTCCG rv: TTAATCAGTGAGGCACCTAT	Grimm et al., 2004
	<i>bla_{PSE}</i>	419	fw: CGCTTCCCGTTAACAAGTAC rv: CTGGTTCATTTTCAGATAGCG	Sandvang et al., 2002

4.3. ETAPA 3: Determinação do perfil de resistência fenotípica em *Escherichia coli* isoladas de fezes e perfil de microbiota intestinal de suínos submetidos à diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração

4.3.1 Delineamento

Foi conduzido um estudo observacional/longitudinal, em quatro grupos de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração.

- **Grupo 1:** sem o uso de antimicrobianos via ração. Granja de ciclo completo, que comprovadamente não utiliza antimicrobianos via ração e água, desde 2008. A granja conta com 21 matrizes, produz aproximadamente 462 suínos por ano e aloja, a cada 21 dias, três matrizes na maternidade. Essas matrizes, de genótipo 50% Landrace - 25% Large White - 25% Moura, fazem parte de um sistema de validação de carne de qualidade da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia, Santa Catarina.

- **Grupo 2:** uso de pulsos antimicrobianos via ração administrada aos leitões. Grupo composto por animais oriundos da mesma granja do Grupo 1, porém, após o desmame (28 dias), os leitões foram separados e receberam três pulsos de antimicrobianos via ração até os 108 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Pulsos de antimicrobianos administrados via ração após o desmame de leitões do Grupo 2.

Idade do suíno (dias)	Medicamento
29-39	Colistina (120 ppm)
49-59	Doxiciclina (200 ppm)
98 - 108	Tiamulina (120 ppm)
	Florfenicol (40 ppm)

- **Grupo 3:** uso contínuo de dois antimicrobianos via ração em todas as fases de criação. Os animais pertenciam a granja de ciclo completo, com 55 matrizes, de produção familiar, produzindo cerca de 1.100 leitões por ano, alojando três porcas a cada 21 dias. Antes do parto, foi administrada uma dose da vacina pra *Escherichia coli* e Rinite (Intervet) nas porcas, e no terceiro dia de vida dos leitões uma dose da vacina Respisure® (Pfizer). A ração era misturada na propriedade, sendo utilizados os núcleos e concentrados, comercializados pela Agroceres Multimix, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Núcleos e concentrados utilizados na ração fornecida aos suínos do Grupo 3.

Ração	Idade do suíno (dias)	Núcleo/concentrado	Medicamento
Porca	-	Núcleo Advanced SUI 2080 Reprodução	Não medicada
Ração I	0-28	Concentrado AGMIX Milk 30%	Colistina 133 mg/kg
Ração II	29-35	Concentrado AGMIX 20%	Colistina 133 mg/kg
Ração III	36-45	Concentrado Focus 7203 SUI 10%	Colistina 133 mg/kg
Ração IV	46-63	Núcleo Advanced SUI 2079 inicial	Halquinol 4.000 mg/kg
Ração V	64-130	Núcleo Advanced SUI 2017 Recria	Lincomicina 733 mg/kg

- **Grupo 4:** submetidos ao uso contínuo de seis antimicrobianos, via ração, em todas as fases de criação. Os animais estavam alojados em granja UPL, que conta com 1200 matrizes, produzindo 28.800 leitões por ano. Após o parto, foi administrada uma dose de amoxicilina (Clamoxil LA®) nas matrizes (0,1 mL/Kg), e no terceiro dia de vida dos leitões, 0,1 mL de ceftiofur (Excede®). O protocolo de antimicrobianos utilizados via ração está descrito na

Tabela 5. Para viabilizar o estudo, os lotes amostrados permaneceram na granja, em baias separadas, até idade de abate.

Tabela 5. Antimicrobianos utilizados via ração nas diversas fases zootécnicas dos suínos do Grupo 4.

Ração	Idade do suíno (dias)	Princípio ativo	Dose
Maternidade	0-28	Clorohidroxiquinolina CHQ (halquinol)	120 ppm
Pré-I (40%)	29-35	Florfenicol Norfloxacina	60 ppm 200 ppm
Pré-II (20%)	36-45	Colistina Neomicina	200 ppm 200 ppm
Inicial (3%)	46-63	Clorohidroxiquinolina CHQ (halquinol) Tiamulina	120 ppm 150 ppm
Crescimento/ terminação	64-110	Tilosina	80 ppm

Dois lotes de cada grupo de animais foram amostrados do nascimento ao final da terminação. Em cada lote, foram selecionados os dois leitões mais pesados de três porcas alojadas no mesmo grupo de maternidade. Os leitões foram identificados por mocha e amostrados seis vezes, conforme Tabela 6. As amostras, de aproximadamente 5 g de fezes, foram colhidas em tubos tipo falcon estéreis e mantidos em caixas isotérmicas com gelo até a chegada ao laboratório. As amostras foram processadas e estocadas no laboratório de Bacteriologia de Suínos – Segurança Alimentar, do Complexo de Laboratórios de Sanidade e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves (CLSGA), em Concórdia, SC.

Tabela 6. Cronograma de coleta de fezes dos animais pertencentes aos quatro grupos de observação.

Coleta	Idade	Fase
1	10 – 15 dias	Maternidade
2	32 dias	Creche
3	45 – 50 dias	Creche
4	63 dias	Creche
5	90 dias	Crescimento
6	140 dias	Terminação

4.3.2 Contagem de *Escherichia coli*

Alíquotas de 1 g de fezes foram suspendidas em 9 mL de solução salina 0,85% estéril; a partir dessa suspensão foram preparadas diluições seriadas até 10⁻⁵. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram distribuídas na superfície do ágar Eosina-Azul de Metileno (EMB, Oxoid) para contagem. As placas foram incubadas à 35±2°C, por 24-48 horas. Colônias que apresentavam coloração verde metálica, consideradas típicas de *E. coli*, foram contadas. Seis colônias foram selecionadas para a confirmação fenotípica de *E. coli* por testes bioquímicos, conforme Quinn et al. (2011). A partir de cada amostra de fezes, três colônias de *E. coli* foram estocadas. Para tanto, os isolados foram cultivados em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) por 18-24 horas e, posteriormente, acrescidos de 20% de glicerol e congelados à -70°C. As contagens de *E. coli* obtidas foram transformadas em logaritmo (log₁₀) e analisadas pelo teste de ANOVA e as medianas obtidas foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer (múltiplas médias). Para análise foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 23.0.02, com nível de confiança de 95%.

4.3.3 Seleção de bactérias ESBL positivas

Para seleção de bactérias produtores de β-lactamases de espectro ampliado, 0,5 g de fezes foi transferida para caldo BHI acrescido de 1µg/mL de ceftazidima, adaptado conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* para teste de triagem de bactérias ESBL positivas (CLSI, 2012). Essas amostras foram incubadas por 20-24 horas à 35±2°C. Após, 10 µl foi transferido para placas de ágar cromogênico *chromoID ESBL*® (BioMerieux®), incubadas nas mesmas condições. Colônias com coloração rosa (sugestivas de *E. coli*),

verde/azul (sugestivas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) e castanhas (sugestivas de *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*) foram confirmadas fenotipicamente por testes bioquímicos (QUINN et al., 2011) e estocadas em caldo BHI com 20% de glicerol à -70°C.

4.3.4 Determinação do perfil fenotípico de resistência antimicrobiana dos isolados de Escherichia coli

Um isolado de *E. coli* proveniente de cada animal em cada coleta dos quatro grupos estudados foram avaliados quanto ao perfil de resistência antimicrobiana, pelo teste de difusão em ágar Muller–Hinton (Oxoid), realizado e interpretado de acordo com as normas dos documentos M31-A3 e M100-S22 (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Foram testados os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 µg); ampicilina (10 µg); cefotaxima (30 µg); ceftazidima (30 µg); ciprofloxacina (5 µg); cloranfenicol (30 µg); gentamicina (10 µg); florfenicol (30 µg); sulfonamidas (300 µg); e tetraciclina (30 µg). Os isolados positivos ao teste de triagem para produtores de ESBL foram submetidos ao teste fenotípico confirmatório (CLSI, 2012).

As frequências de resistência antimicrobiana dos isolados foram comparados através do teste não-paramétrico qui-quadrado (χ^2), com nível de confiança de 95%. Após foi realizado o procedimento de Marascuilo para estabelecer quais categorias diferiram entre si (VIERA, 2010).

4.3.5 Análise de sequências do gene 16S rRNA com a Plataforma Ion Torrent PGM

Para análise do perfil de microbiota através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma IonTorrent, foram utilizadas fezes de quatro leitões de um ciclo de amostragem, nas fases descritas na Tabela 7 (4 animais x 4 coletas x 1 lote x 4 grupos), totalizando 64 amostras.

O DNA total foi extraído a partir de 0.25 g de fezes por meio do kit PowerFecal DNA (MoBio), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado pelo Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), padronizados para 10 ng/µl e estocados a -20° C.

A região V5-V6 do gene 16S rRNA foi escolhida para ser estudada, por apresentar um tamanho aproximado de 310 bases, compatível com a plataforma IonTorrent PGM. Os oligonucleotídeos iniciadores foram 785F (5'- GGATTAGATACCCBRGTAGTC) e 1061R

(5'- TCACGRCACGAGCTGACGAC) (ZAURA et al., 2009), sintetizados com os barcodes específicos já incorporados (*primer fusion*).

Tabela 7. Coletas incluídas na análise do gene 16S rRNA do DNA total das fezes de suínos em cada um dos quatro grupos observados. Em cada coleta foram analisados quatro animais.

Coleta	Idade dos suínos	Fase
1	10 – 15 dias	Maternidade
2	32 dias	Creche
3	45 – 50 dias	Creche
4	63 dias	Creche

Cada reação de PCR foi realizada para um volume final de 25 μ L, sendo deste volume 18,4 μ L água ultrapura, 0,5 μ L de cada primer, 5 μ L Tampão 10 X, 2 μ L MgCl₂ 50 mM, 1 μ L dNTP's mix 2,5 mM, 0,2 μ L Taq Polimerase High Fidelity 5 U/ μ L, e 4 μ L template DNA. As condições de reação programadas foram: 3 min a 94°C; 22 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 58°C; e 1 min a 68°C; e 7 min a 68°C.

Os amplicons foram purificados com AMPure® e quantificados através do Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific). Após padronização da biblioteca para 26 pM, foi realizado o PCR de emulsão no aparelho Ion OneTouch OT2, com o kit Ion PGM Template OT2 400, conforme protocolo. O amplicon gerado foi quantificado novamente no Qubit® 2.0 *Fluorometer* com o uso do kit Ion Sphere™ Quality Control, com o objetivo de verificar se o percentual de ISPs era aceitável para a etapa de enriquecimento no aparelho Ion OneTouch™ ES. Após o enriquecimento, a biblioteca foi sequenciada pelo Ion PGM. O chip 318 v2 foi escolhido para o sequenciamento, pois em uma única corrida pode gerar até 125 mil leituras por amostra, quantidade suficiente para análise de diversidade bacteriana.

As seqüências foram analisadas pelo software *mothur* versão 1.34.4 (SCHLOSS et al., 2009) para controle de qualidade, análise beta-diversidade e classificação taxonômica de acordo com o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013). Foi realizada análise estatística para detectar diferenças significativas ($P < 0,05$) na distribuição taxonômica entre as coletas e grupo, mantendo as reads não classificadas, no software *Statistical Analyses of Metagenomic Profiles* (STAMP) (PARKS et al., 2014).

4.3.6 Análise de sequências do gene 16S rRNA com a Plataforma MiSeq (Illumina)

Já para a plataforma MiSeq, foram utilizadas fezes de quatro leitões de um ciclo de amostragem, nas fases descritas na Tabela 8 (4 animais x 5 coletas x 1 lote x 4 grupos), totalizando 80 amostras.

Tabela 8. Coletas incluídas na análise do gene 16S rRNA do DNA total das fezes de suínos em cada um dos quatro grupos observados. Em cada coleta foram analisados quatro animais.

Coleta	Idade dos suínos	Fase
1	10 – 15 dias	Maternidade
2	32 dias	Creche
3	45 – 50 dias	Creche
4	63 dias	Creche
6	140 dias	Terminação

O DNA total das fezes foi extraído por meio do kit PowerFecal DNA (MoBio) e quantificado pelo Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific), conforme o item 4.3.6. A região V1-V3 do gene 16S rRNA foi escolhida para ser estudada nesta plataforma, apresentando tamanho aproximado de 540 pb.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram forward (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG) (WEISBURG et al., 1991) e reverse (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG) (MUYZER et al., 1993) com diferentes barcodes já incorporados na sequência, de acordo com o protocolo descrito por Kozich et al. (2013). Para reação de PCR foi adicionado ao mix 2 µL de cada primer, 17 µL AccuPrime™ Pfx SuperMix (Life Technologies) e 1 µL do template DNA. O programa utilizado seguiu os seguintes parâmetros: 2 min a 95°C; 30 ciclos de 20s a 95°C, 15s a 55°C; e 5 min a 72°C; e 10 min a 72°C. Os amplicons foram normalizados com o kit SequalPrep Normalization Plate (Life Technologies) e agrupados. A biblioteca foi quantificada através do Bioanalyzer High Sensitivity DNA (Agilent Technologies) e Kapa Q-PCR Library Quantification (KapaBiosystems), com os parâmetros de 5 min a 95°C; 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 60°C; e 90s a 60°C. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) versão 3 (300x2), de acordo com o protocolo do fabricante.

A análise dos dados de sequenciamento e classificação taxonômica usando o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013) foram realizadas com o pacote de software *mothur*

versão 1.34.4 (SCHLOSS et al., 2009). Após alinhamento, foram removidas as reads que apresentavam >500 bp; presença de homopolímeros >8 bp; classificadas como não bactérias; e, presença apenas uma ou duas vezes em todas as amostras (*singletons* e *doubletons*). O T-test com correção Storey FDR foi empregado para detectar diferenças significativas na distribuição taxonômica entre as coletas e grupo, mantendo as *reads* não classificadas, no software STAMP (PARKS et al., 2014). Diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas significativas.

5. RESULTADOS

5.1 ETAPA 1: Determinação do perfil de resistência fenotípica e perfil clonal entre isolados de *Escherichia coli* de fezes e carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento

Entre os 674 isolados de *E. coli* testados, 7,4% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Os susceptíveis representaram 0,4%, 10,2% e 11,6% do total de isolados originado dos matadouros frigoríficos A, B e C, respectivamente. As maiores frequências de resistência foram identificadas frente à tetraciclina (85,9%), ampicilina (73%), sulfonamida (70%), florfenicol (65%) e ácido nalidíxico (58,9%) (Tabela 9). Índices inferiores a 1% de resistentes à cefotaxima ou ceftazidima foram encontrados, indicando uma baixa frequência de isolados com perfil compatível com *E. coli* produtora de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). A frequência de isolados resistentes frente à ampicilina, florfenicol, sulfonamida e tetraciclina foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo originado de fezes do que de carcaças. Em relação aos demais antimicrobianos não houve diferença significativa entre origens, no que diz respeito à frequência de isolados resistentes.

Tabela 9. Frequência de isolados de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos em fezes e carcaças suínas em três matadouros-frigoríficos.

Antimicrobiano	Fezes (n = 355)		Carcaça (n = 319)		Total (n= 674)		P valor
	Resistente	%	Resistente	%	Resistente	%	
Ácido Nalidíxico	213	60,0	184	57,7	397	58,9	0,541
Ampicilina	287	80,8	205	64,3	492	73,0	< 0,001
Cefotaxima	2	0,6	3	0,9	5	0,7	0,569
Ceftazima	0	0,0	2	0,6	2	0,3	0,135
Florfenicol	259	73,0	179	56,1	438	65,0	< 0,001
Gentamicina	33	9,3	23	7,2	56	8,3	0,327
Sulfonamida	265	74,6	207	64,9	472	70,0	0,006
Tetraciclina	326	91,8	253	79,3	579	85,9	< 0,001

Do total de isolados de *E. coli*, 79,5% (536/674) foram classificados como multirresistentes. Entre os matadouros-frigoríficos (A, B, C) houve diferença significativa ($P = 0,006$) entre as frequências de isolados multirresistentes, que representaram 86,6%

(194/224), 75,8% (185/244) e 76,2% (157/206), respectivamente. No total, foram encontrados 33 perfis multirresistentes distintos, sendo o mais frequente nos dois grupos de isolados e em todos os matadouros-frigoríficos [AmpFloNalSulTet], seguido de [AmpFloSulTet] (Tabela 10).

Tabela 10. Perfis de multirresistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C).

<i>Perfil de multirresistência</i>	<i>Fezes</i>				<i>Carcaças</i>			
	A	B	C	Total	A	B	C	Total
AmpFloNalSulTet	34	30	25	89	42	28	8	78
AmpFloSulTet	22	21	12	55	12	11	12	35
AmpFloNalTet	8	8	7	23	7	7	1	15
FloNalSulTet	4	1	9	14	14	5	2	21
AmpNalSulTet	5	1	6	12	2	4	16	22

Amp: ampicilina; Flo: florfenicol; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina

A análise de macro restrição (PFGE), conduzida em isolados apresentando os perfis de multirresistência mais prevalentes, demonstrou que isolados de fezes e carcaças eram, na maioria dos casos, relacionados (similaridade $\geq 70\%$) nos três matadouros-frigoríficos. No matadouro A, quatro grupos de isolados relacionados foram formados, incluindo de três até oito isolados com perfis de resistência comuns e de ambas as origens. Com exceção de dois isolados, todos os demais obtidos no estabelecimento B foram agrupados em um *cluster* relacionado, o qual apresentou predominantemente o perfil [AmpFloNalSulTet]. Em C, houve maior diversidade de pulsotipos, sendo formados dois grupos que incluíram entre oito e nove isolados; e seis pulsotipos não relacionados representados por isolados únicos ou duplos (Figura 2).

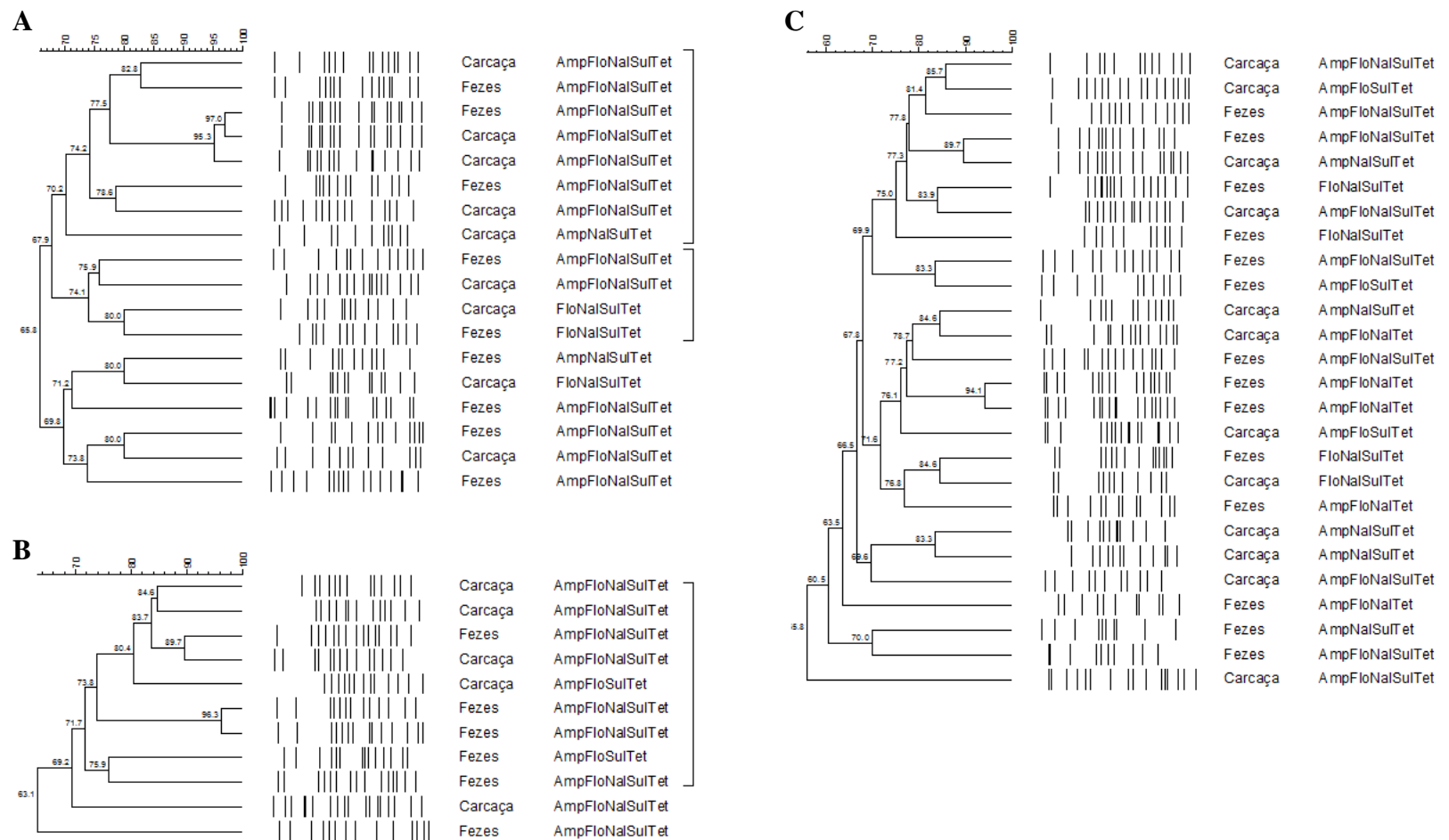


Figura 2. Perfis de macro restrição e de multirresistência de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos. Os grupos de isolados relacionados (similaridade $\geq 70\%$) estão marcados com colchetes. Amp: ampicilina; Flo: florfenicol; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina.

5.2 ETAPA 2: Determinação do perfil de genes de resistência em *Escherichia coli* provenientes de carcaça suínas na fase de pré-resfriamento

Duzentos e vinte e oito isolados originados de carcaças suínas e que apresentaram perfil multirresistente na Etapa 1 foram testados quanto à suscetibilidade à dez outros antimicrobianos. Considerando todos os antimicrobianos testados, as maiores frequências de resistência foram identificadas frente à tetraciclina (97,8%), cloranfenicol (86,4%), sulfonamida (85,1%), ampicilina (81,1%), florfenicol (77,2%), ácido nalidíxico (75,9%), estreptomicina (65,8%) e trimetoprima (57%) (Tabela 11). Não foram encontrados isolados resistentes ao ertapenem e fosmomicina. Considerando o matadouro-frigorífico de origem dos isolados, não houve diferença significativa na frequência de resistentes frente à maioria dos antimicrobianos. Na classe dos fenicóis, observou-se diferença estatística, sendo os isolados provenientes do matadouro-frigorífico A e C os que apresentavam, respectivamente, frequência maior e menor de resistentes frente ao florfenicol e cloranfenicol. Houve diferença significativa na resistência à trimetoprima, sendo a frequência mais elevada encontrada no matadouro-frigorífico A.

Tabela 11. Frequência de isolados de *Escherichia coli* originados de carcaças suínas resistentes à antimicrobianos, em três matadouros-frigoríficos.

	A (n=89)	B (n=75)	C (n=64)	Total (n=228)	P valor
	Resistente %	Resistente %	Resistente %	Resistente %	
Aminoglicosídeos					
Gentamicina	6,7	10,7	14,1	10,1	0,326
Tobramicina	5,6	16,0	9,4	10,1	0,087
Amicacina	0	1,3	0	0,4	0,359
Canamicina	30,3	38,7	26,6	32,0	0,285
Netilmicina	2,2	5,3	7,8	4,8	0,276
Estreptomicina	68,5	70,7	56,2	65,8	0,159
Quinolona					
Ácido nalidíxico	79,8	76,0	70,3	75,9	0,402
β-lactâmicos					
Ampicilina	82,02	84,0	76,56	81,1	0,516
Cefotaxima	0	2,67	1,56	1,3	0,321
Ceftazidima	0	2,67	0	0,9	0,128
Fenicóis					
Florfenicol	95,5	88,0	39,1	77,2	< 0,001
Cloranfenicol	97,7	88,0	68,7	86,4	< 0,001
Tetraciclinas					
Tetraciclina	96,6	97,3	100	97,8	0,352

Nitrofuranos

Nitrofurantoina	1,1	1,3	1,6	1,3	0,973
Trimetoprima	66,3	56,0	45,3	57,0	0,035
Sulfonamida	88,8	77,3	89,1	85,1	0,071

Para isolados resistentes ao ácido nalidíxico foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para ciprofloxacina (Tabela 12). De acordo com o ponto de corte estabelecido pelo CLSI, 17,4% (30/172) desses isolados foram resistentes à ciprofloxacina. Entretanto, se aplicado o ponto de corte epidemiológico do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – EUCAST (ECOFF = 0,064), um total de 165 (95,9%) isolados seria considerado não pertencente à população selvagem, indicando que já adquiriram algum grau de resistência.

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ciprofloxacina para isolados de *Escherichia coli* resistentes à ácido nalidíxico.

Antimicrobiano CIM µ/mL	n	Número de isolados com CIM (µg/mL) de:												
		0,012	0,024	0,048	0,097	0,125	0,19	0,39	0,78	1,56	3,12	4,68	6,25	9,37
Ciprofloxacina (0,012 – 6,25)	172	2	2	3	3	78	43	9	1	1	30			

n: número de isolados; a linha indica o ponto de corte segundo CLSI (2012)

Os 228 isolados multirresistentes de *E. coli* apresentaram entre 3 e 11 marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana (Figura 3). Nos frigoríficos A e B, 75% dos isolados apresentaram perfis com até oito marcadores, enquanto no frigorífico C esse mesmo percentual de isolados apresentou até sete marcadores.

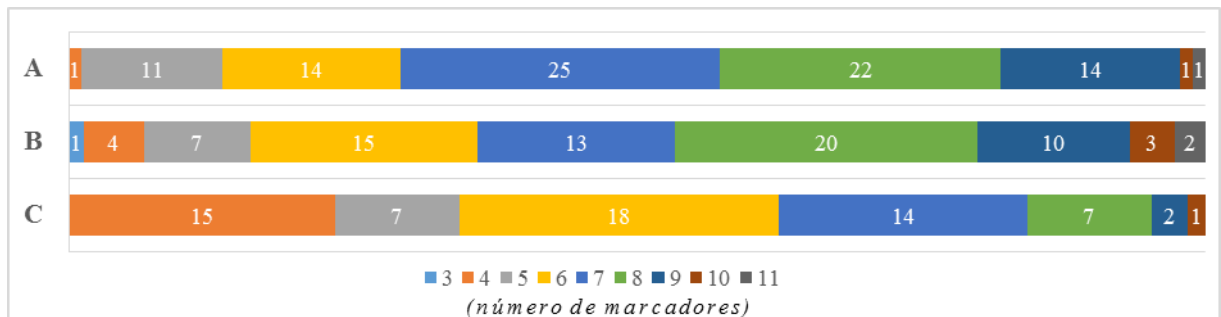


Figura 3. Distribuição de isolados de *Escherichia coli* multirresistentes, de acordo com a quantidade de marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana identificados, em três matadouro-frigoríficos (A, B e C).

Foram identificados 85 perfis distintos de multirresistência, sendo que 50 perfis estavam presentes em apenas um isolado. Os perfis mais encontrados foram [AmpCloEstFloNalSulTetTri] e [AmpCanCloEstFloNalSulTetTri], os quais incluem todas as classes de antimicrobianos testadas, exceto os nitrofuranos (Tabela 13).

Tabela 13. Cinco perfis de multirresistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de *Escherichia coli* provenientes de carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C).

Origem	Perfil	Número de isolados
Frigorífico A	AmpCloEstFloNalSulTetTri	14
	AmpCanCloEstFloNalSulTetTri	12
	AmpCloEstFloNalSulTet	7
	AmpCloFloNalTet	6
	AmpCloFloNalSulTet	5
Frigorífico B	AmpCloEstFloNalSulTetTri	9
	AmpCanCloEstFloNalSulTetTri	5
	AmpCanCloEstFloNalSulTet	5
	AmpCloFloNalTet	4
	CanCloEstFloNalSulTet	4
Frigorífico C	AmpCloSulTet	4
	AmpCloEstNalSulTetTri	4
	AmpNalSulTet	4
	AmpEstNalTet	4
	AmpEstNalSulTetTri	3

Amp: ampicilina; Can: canamicina; Clo: cloranfenicol; Est: Estreptomicina; Flo: florfenicol; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina; Tri: trimetoprima

Vinte e sete isolados multirresistentes que foram submetidos à pesquisa de 15 diferentes genes de resistência e ao PFGE estão representados na Figura 4. Em relação aos genes de resistência, não foram detectados *bla_{PSE}*, *sul1*, *catA1*, *tetG*, *ant2* e *strB* em nenhuma das amostras. Os genes detectados foram, por ordem de frequência: *strA* (83,3%); *aac(3)IV*; (70%); *tetB* (70%); *sul2* (60%); *floR* (56,6%); *tetA* (50%); *aph(3)Ia* (43,3%); *sul3* (26,6%) e *bla_{TEM}* (10%). Dos cinco isolados que apresentaram resistência às cefalosporinas, apenas uma cepa foi positiva no teste fenotípico confirmatório para produção de ESBL. Entretanto em três desses isolados, incluindo o único positivo no teste confirmatório, o gene *bla_{TEM}* foi detectado.

Entre os 23 isolados que apresentaram fenótipo de resistência à sulfonamida, 16 apresentavam o gene *sul2*, seis o *sul3* e um isolado ambos os genes. Em um isolado fenotipicamente resistente não foi possível detectar o gene *sul*. Todos os 26 isolados

representados na Figura 4 apresentaram algum gene de resistência à tetraciclina: somente *tetA* (7 isolados); somente *tetB* (12 isolados); *teA* e *tetB* (7 isolados). Um isolado fenotipicamente suscetível à tetraciclina carregava genes *tet*.

Dos 21 isolados que apresentaram resistência fenotípica concomitante para florfenicol e cloranfenicol, 16 isolados apresentaram o gene *florR* e em cinco nenhum dos genes investigados foi encontrado. Dois isolados que apresentaram somente resistência ao florfenicol foram negativos para os genes testados.

Em relação aos aminoglicosídeos, em 21 isolados resistentes à estreptomicina houve a presença do gene *strA*. Em dois isolados fenotipicamente resistente, esse gene não foi encontrado. Em 18 isolados o gene *aac(3)IV* foi amplificado, desses isolados 16 apresentaram perfil de resistência à gentamicina, tobramicina e/ou netilmicina em diferentes combinações. Dois isolados carregavam o gene *aac(3)IV*, porém não apresentavam resistência aos aminoglicosídeos testados. Em relação à canamicina, 12 isolados apresentaram resistência fenotípica e presença do gene *aph(3)Ia*; em dois isolados resistentes o gene não foi detectado.

Na análise de macro restrição (PFGE), três grupos relacionados (similaridade $\geq 70\%$) foram formados, enquanto oito pulsotipos apresentaram isolados únicos ou duplos. O primeiro grupo incluiu sete isolados, sendo três idênticos no PFGE, fenótipo e genótipo de resistência. Apesar de provenientes de um mesmo matadouro-frigorífico (C), os isolados indistinguíveis eram originados de carcaças distintas. Situação semelhante foi observada no segundo grupo, onde quatro isolados provenientes de carcaças distintas de um mesmo matadouro-frigorífico (B) apresentaram pulsotipo e genótipo de resistência indistinguíveis. O terceiro grupo incluiu três isolados do mesmo matadouro-frigorífico que apresentaram fenótipo de resistência indistinguível e pulsotipos relacionados.

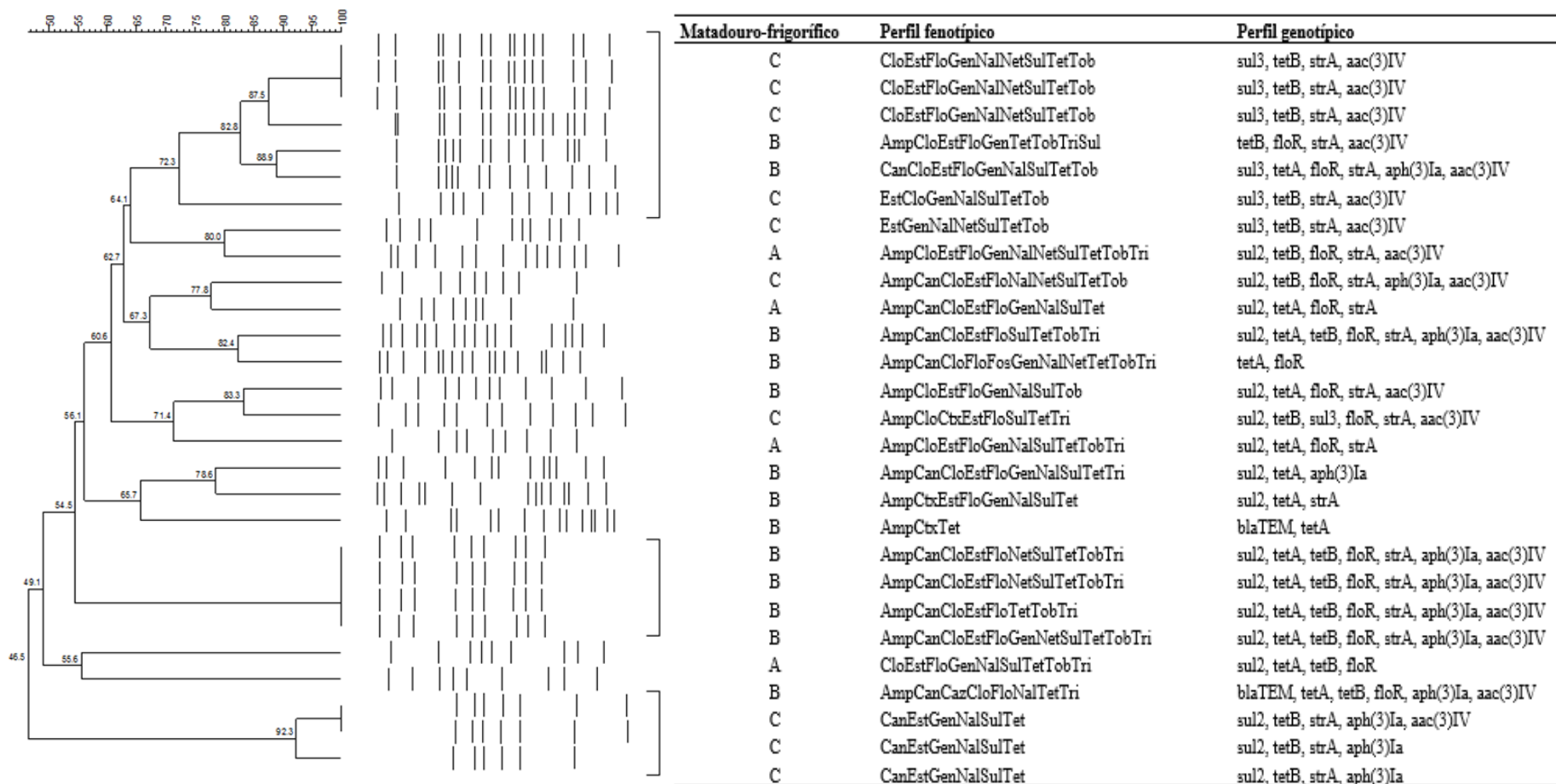


Figura 4. Perfis de macro restrição e de multirresistência de isolados de *Escherichia coli* multirresistentes provenientes de carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos. Os grupos de isolados relacionados (similaridade $\geq 70\%$) estão marcados com colchetes.

Amp: ampicilina; Can: canamicina; Clo: cloranfenicol; Est: Estreptomicina; Flo: florfenicol; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina; Tri: trimetoprima.

5.3. ETAPA 3: Determinação do perfil de resistência fenotípica em *Escherichia coli* isoladas de fezes e perfil de microbiota intestinal de suínos submetidos a diferentes protocolos de uso de antimicrobianos via ração

Primeiramente, os quatro grupos de suínos que receberam diferentes protocolos de uso de antimicrobianos foram avaliados quanto ao perfil da microbiota intestinal. Para tanto, duas regiões hipervariáveis distintas do gene 16S rRNA foram sequenciadas em amostra de DNA total de fezes dos suínos de cada um dos grupos.

No estudo da microbiota intestinal, utilizando a região V1-V3 do gene 16S rRNA, um total de 853.301 *reads* de 488 bases em média (variação de 280 a 582 bases) foram sequenciadas na plataforma MiSeq (Illumina). As sequências que apresentaram *reads* maiores que 500 bases e homopolímeros com oito bases, além das sequências únicas, foram descartadas. Após, as sequências foram alinhadas com as do banco de referência SILVA, e excluídas as sequências não correspondentes a bactérias. Por este tratamento, foram removidas 670.950 sequências, sendo, então, utilizados 164.351 *reads* para análise da diversidade bacteriana. Para análise estatística, as sequências pertencentes à primeira coleta (pós-nascimento) foram excluídas, uma vez que a microbiota do animal sofre alteração após o desmame, independente do uso de antimicrobianos, fato que poderia introduzir um viés na análise.

A análise estatística da composição da microbiota intestinal dos grupos demonstrou que não houve diferença significativa na composição da comunidade microbiana ao longo das coletas, nem pela aplicação de diferentes protocolos de antimicrobianos via ração. A maioria das sequências classificáveis pertenciam aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (58-94%) (Figura 5). O filo *Proteobacteria* participou com apenas 20 a 35% da microbiota identificada. Dos *Bacteroidetes* o gênero *Prevotella* (Figura 6) foi o mais frequente, assim como *Oscillibacter* foi o mais encontrado entre os *Firmicutes*. Entre as *Proteobacterias* o gênero *Succinivibrio* foi o mais frequente.

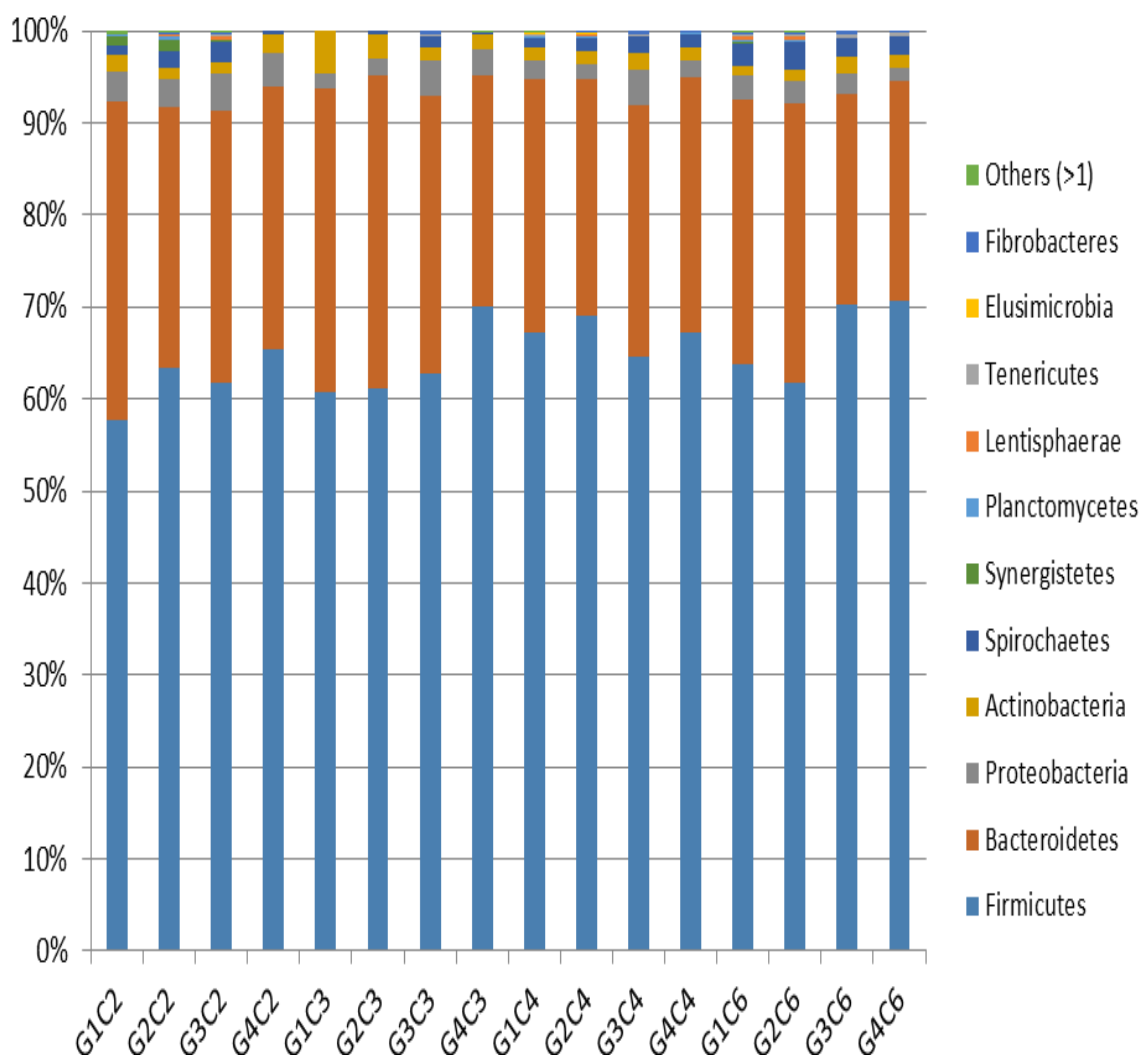


Figura 5. Filos classificáveis referente a média dos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração, sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina).

G1C2 - grupo 1, coleta 2; G2C2 - grupo 2, coleta 2; G3C2 - grupo 2, coleta 2; G4C2 - grupo 4, coleta 2; G1C3 - grupo 1, coleta 3; G2C3 - grupo 2, coleta 3; G3C3 - grupo 3, coleta 3; G4C3 - grupo 4, coleta 3; G1C4 - grupo 1, coleta 4; G2C4 - grupo 2, coleta 4; G3C4 - grupo 3, coleta 4; G4C4 - grupo 4, coleta 4; G1C6 - grupo 1, coleta 6; G2C6 - grupo 2, coleta 6; G3C6 - grupo 3, coleta 6; G4C6 - grupo 4, coleta 6.

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

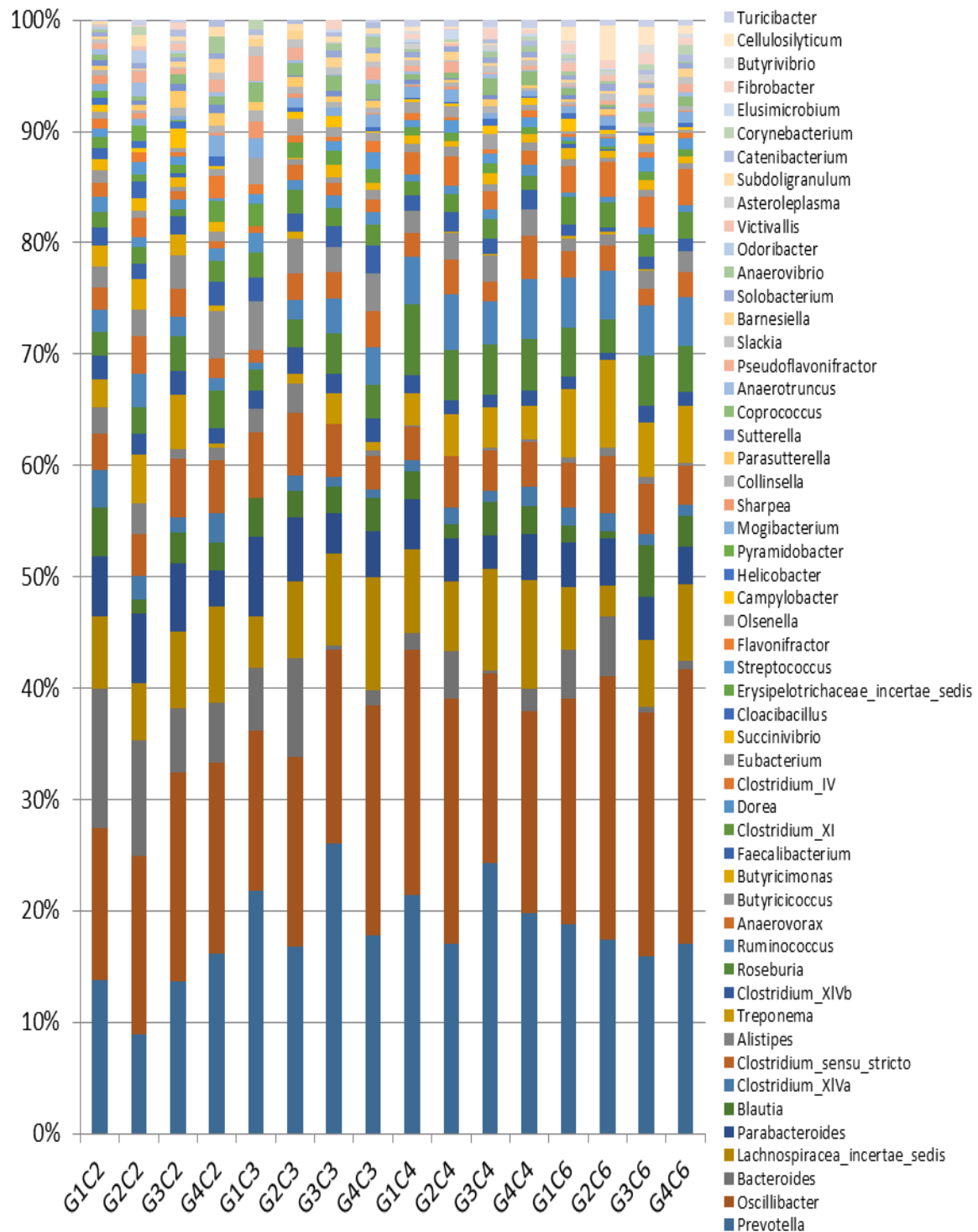


Figura 6. Composição da microbiota bacteriana no nível de gênero referente a médis dos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração, sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina).

G1C2 - grupo 1, coleta 2; G2C2 - grupo 2, coleta 2; G3C2 - grupo 2, coleta 2; G4C2 - grupo 4, coleta 2; G1C3 - grupo 1, coleta 3; G2C3 - grupo 2, coleta 3; G3C3 - grupo 3, coleta 3; G4C3 - grupo 4, coleta 3; G1C4 - grupo 1, coleta 4; G2C4 - grupo 2, coleta 4; G3C4 - grupo 3, coleta 4; G4C4 - grupo 4, coleta 4; G1C6 - grupo 1, coleta 6; G2C6 - grupo 2, coleta 6; G3C6 - grupo 3, coleta 6; G4C6 - grupo 4, coleta 6.

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

Na outra abordagem do estudo da microbiota intestinal, onde a região alvo foi V5-V6 do gene 16S rRNA, o sequenciamento foi feito na plataforma IonTorrent, gerando produtos com cerca de 310 bases. Cerca de 1.016.838 *reads* foram sequenciadas na plataforma, e foram submetidas ao mesmo tratamento descrito no sequenciamento da região V1-V3. Após a retirada de 745.520 seqüências, um total de 271.318 *reads* foram utilizadas para análise. Como na análise anterior, a primeira coleta foi excluída.

A avaliação da região V5-V6 do gene 16S rRNA apresentou resultado semelhante àquela obtida com a região V1-V3, onde os grupos não apresentaram diferença significativa ao longo das fases ou como resultado da administração de protocolos distintos de antimicrobianos na ração. Semelhante ao encontrado na avaliação da região V1-V3, os filos *Bacterioidetes* e *Firmicutes* (38-95%) predominaram (Figura 7).

Os gêneros mais frequentes foram *Prevotella* e *Bacteroides*, ambos do filo *Bacterioidetes*. O gênero *Oscillibacter* foi o quarto mais frequente após o gênero *Lactobacillus*, ambos pertencentes ao filo *Firmicutes* (Figura 8). Do filo *Proteobacteria*, o gênero mais frequente foi *Succinivibrio*.

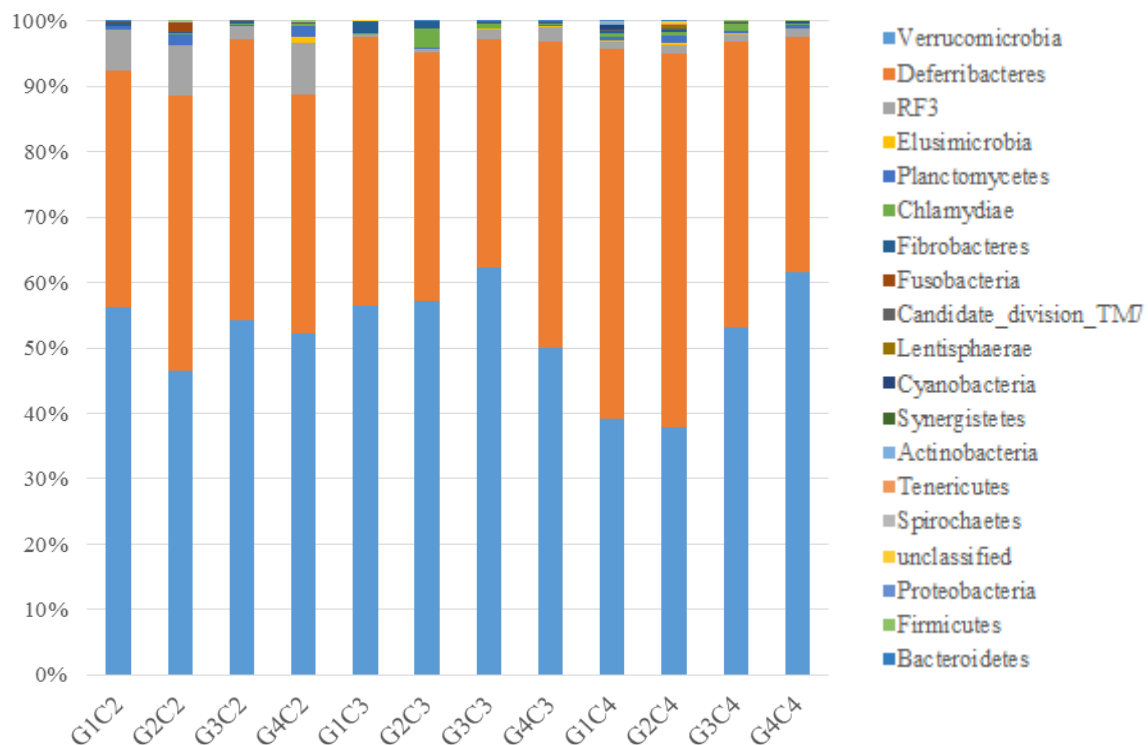


Figura 7. Composição da microbiota bacteriana no nível de filo referente a média dos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de antimicrobianos via ração em 4 coletas distintas, sequenciados na plataforma IonTorrent PGM.

G1C2 - grupo 1, coleta 2; G2C2 - grupo 2, coleta 2; G3C2 - grupo 2, coleta 2; G4C2 - grupo 4, coleta 2; G1C3 - grupo 1, coleta 3; G2C3 - grupo 2, coleta 3; G3C3 - grupo 3, coleta 3; G4C3 - grupo 4, coleta 3; G1C4 - grupo 1, coleta 4; G2C4 - grupo 2, coleta 4; G3C4 - grupo 3, coleta 4; G4C4 - grupo 4, coleta 4; G1C6 - grupo 1, coleta 6; G2C6 - grupo 2, coleta 6; G3C6 - grupo 3, coleta 6; G4C6 - grupo 4, coleta 6.

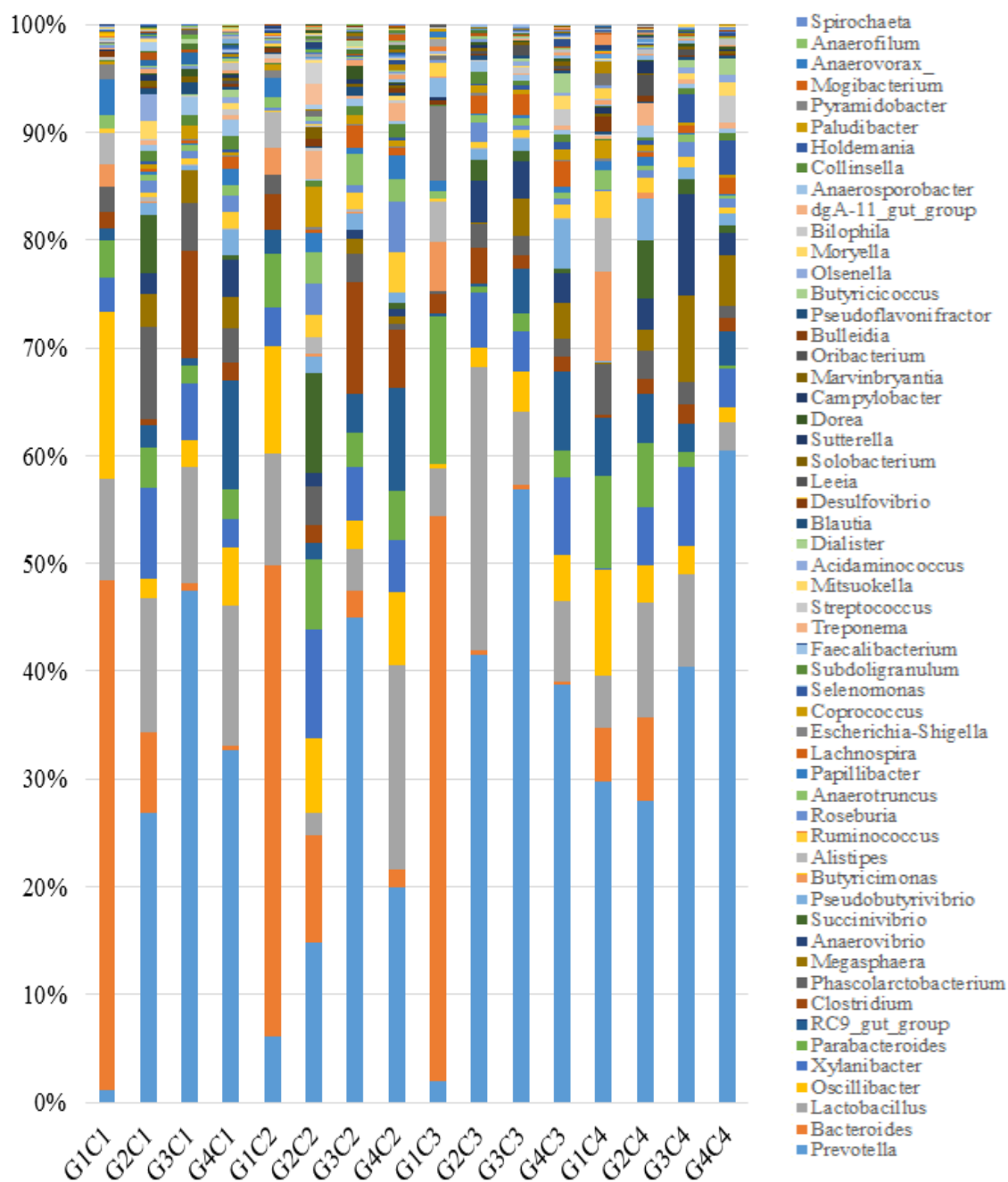


Figura 8. Composição da microbiota bacteriana no nível de gênero referente a média dos animais de quatro grupos com diferentes protocolos de antimicrobianos via ração em quatro coletas distintas, sequenciados na plataforma IonTorrent PGM.

G1C2 - grupo 1, coleta 2; G2C2 - grupo 2, coleta 2; G3C2 - grupo 2, coleta 2; G4C2 - grupo 4, coleta 2; G1C3 - grupo 1, coleta 3; G2C3 - grupo 2, coleta 3; G3C3 - grupo 3, coleta 3; G4C3 - grupo 4, coleta 3; G1C4 - grupo 1, coleta 4; G2C4 - grupo 2, coleta 4; G3C4 - grupo 3, coleta 4; G4C4 - grupo 4, coleta 4; G1C6 - grupo 1, coleta 6; G2C6 - grupo 2, coleta 6; G3C6 - grupo 3, coleta 6; G4C6 - grupo 4, coleta 6.

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

O gênero *Escherichia*, pertencente ao filo *Proteobacteria*, não figurou entre os grupos majoritários da microbiota intestinal, como pode ser visto nas figuras 6 e 8. A enumeração de *E. coli*, após cultivo em ágar EMB, resultou em grande variabilidade entre animais, porém a mediana das contagens não apresentou diferença significativa entre grupos ($P > 0,05$), ficando entre 5,24 e 5,37 log UFC.g⁻¹ de fezes (Tabela 14).

Tabela 14. Contagem mínima, máxima e mediana de *Escherichia coli* em fezes de suínos pertencentes a grupos submetidos a quatro protocolos de administração de antimicrobianos via ração.

Grupos	Contagem de <i>E. coli</i> (UFC.g ⁻¹)		Mediana de <i>E. coli</i>	
	Mínima	Máxima	UFC.g ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹
1	0,00x10 ⁰	6,34x10 ⁷	2,15 x10 ⁵	5,33
2	3,10x10 ³	4,58x10 ⁷	2,35 x10 ⁵	5,37
3	6,00x10 ¹	1,49x10 ⁷	1,76 x10 ⁵	5,24
4	0,00x10 ⁰	5,64x10 ⁷	1,87 x10 ⁵	5,27

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

Duzentos e setenta e sete isolados de *E. coli* retirados do ágar EMB foram submetidos ao teste de suscetibilidade antimicrobiana (Tabela 15). Destes, 12,3% (34/277) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados e 72,5% (201/277) foram considerados multirresistentes. O Grupo 4 apresentou a maior frequência de multirresistente 31,3% (63/201), seguido dos Grupos 3, 2 e 1 com 25,9% (52/201), 22,4% (45/201) e 20,4% (41/201), respectivamente. Entre grupos houve diferença significativa para ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, florfenicol, sulfonamida e tetraciclina ($P < 0,05$). O Grupo 4 apresentou a frequência mais elevada para todas as drogas citadas. Vinte e sete isolados foram positivos no teste de triagem para ESBL, ou seja, resistentes à ceftazidima e/ou cefotaxima; destes, 20 foram confirmados fenotipicamente. Houve diferença significativa ($P = 0,011$) na ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL entre grupos: cinco isolados (Grupo 1); quatro (Grupo 2); um (Grupo 3); e 10 isolados (Grupo 4).

As amostras de fezes dos mesmos animais, submetidas ao protocolo de seleção de bactérias produtoras de ESBL, resultou na recuperação de 76 colônias suspeitas no ágar cromogênico *chromoID ESBL*®. Destas, 52 colônias foram identificadas como *E. coli*, das quais apenas 20 foram ESBL-positivas no teste confirmatório. Os 20 isolados de *E. coli* ESBL-positivos foram originados do Grupo 1 (5 isolados), Grupo 2 (3 isolados) e Grupo 4

(12 isolados), com diferença significativa entre grupos ($P = 0,019$). No Grupo 3 não houve a confirmação de *E. coli* produtora de ESBL.

Tabela 15. Frequência de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração.

<i>Antimicrobiano</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	<i>P valor</i>
	(n=69)	(n=71)	(n=70)	(n=67)	
	<i>Resistente %</i>	<i>Resistente %</i>	<i>Resistente %</i>	<i>Resistente %</i>	
Ácido Nalidíxico	56,9	49,3 ^a	49,3	70,0 ^b	0,006
Ampicilina	37,5 ^a	52,1	65,8	78,6 ^b	< 0,001
Cefotaxima	12,5	5,6	1,4	15,7	0,008
Ceftazidima	0,0	2,8	0,0	5,7	0,036
Ciprofloxacina	13,9	18,3	20,5	41,4	0,001
Cloranfenicol	26,4 ^a	39,4	54,8	74,3 ^b	< 0,001
Florfenicol	20,8	29,6	42,5	65,7	< 0,001
Gentamicina	8,3	15,5	16,4	12,9	0,398
Sulfonamida	52,8	56,3 ^a	57,5	81,4 ^b	< 0,001
Tetraciclina	61,1	62,0 ^a	72,6	98,5 ^b	< 0,001

Letras diferentes demonstram os grupos que tiveram diferença entre si pelo procedimento de Marascuilo
Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

Os 277 isolados de *E. coli* analisados apresentaram entre 0 e 10 marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana (Figura 9). Os Grupos 1 e 2 apresentaram um maior número de isolados sem marcadores de resistência, 11 e 16 isolados, respectivamente; em contrapartida o Grupo 4 apresentou o maior número de isolados (39) com seis ou mais marcadores.

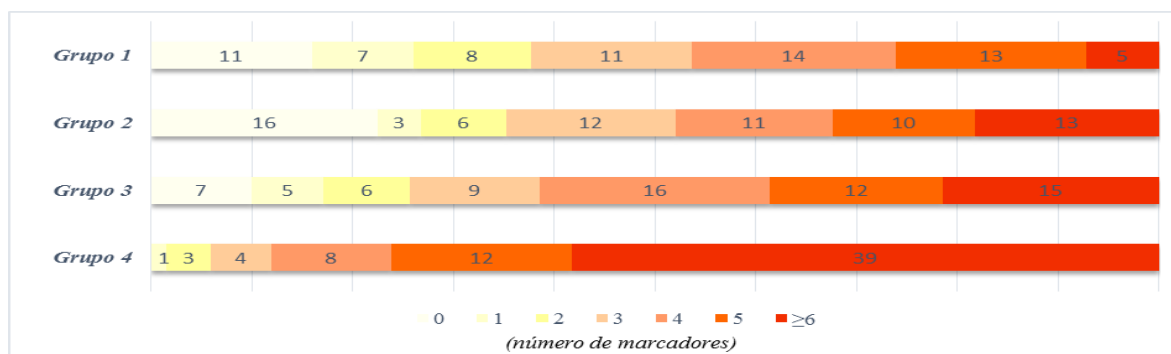


Figura 9. Distribuição de isolados de *Escherichia coli*, de acordo com a quantidade de marcadores fenotípicos de resistência antimicrobiana identificados.

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

Foram encontrados 73 perfis distintos (Tabela 16), sendo que 36 estavam presentes em um único isolado. O perfil mais encontrado, tanto no Grupo 1 quanto no Grupo 2, foi [NalSulTet], já o Grupo 3 apresentou três perfis mais frequentes [AmpCloFloTet], [AmpCloFloSulTet] e [AmpCipCloFloGenNalSulTet]. O Grupo 4 apresentou uma maior diversidade de perfis, sendo o mais prevalente [AmpCloFloNalSulTet].

Tabela 16. Dez perfis de resistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de *E. coli* provenientes de fezes de suínos submetidos a diferentes protocolos de administração de antimicrobianos via ração

Perfil de resistência	Grupos				Total
	1	2	3	4	
AmpCloFloTet	1	7	6	3	17
NalSulTet	7	8	1	0	16
AmpCloFloSulTet	1	1	6	6	14
AmpCipCloFloNalSulTet	0	2	4	7	13
Tet	6	3	3	1	13
AmpCloFloNalSulTet	0	0	3	9	12
AmpSulTet	1	2	4	4	11
AmpCipCloFloGenNalSulTet	1	0	6	2	9
AmpCloNalSulTet	3	4	0	1	8
AmpCloNalSul	3	0	4	0	7

Amp: ampicilina; Caz: ceftazidima; Cip: ciprofloxacina; Clo: cloranfenicol; Ctx: cefotaxima; Flo: florfenicol; Gen: gentamicina; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina; Tri: trimetoprima.

Grupos: 1 - sem antimicrobianos; 2 - animais de granja sem uso de antimicrobianos que receberam três pulsos de antimicrobianos entre 29-108 dias; 3 - granja comercial com uso contínuo de dois antimicrobianos; 4 - granja comercial com uso contínuo de seis antimicrobianos.

6. DISCUSSÃO

Os antimicrobianos têm sido amplamente utilizados na produção animal, quer seja no tratamento e prevenção de doenças ou como promotores de crescimentos. Nos Estados Unidos, estima-se que aproximadamente 80% do consumo geral de antimicrobianos ocorre em animais de produção, incluindo o uso de drogas que também são utilizadas na terapêutica humana (FDA, 2010). Este consumo pode contribuir para o surgimento e seleção de cepas resistentes a antimicrobianos, que podem ser transmitidas para os humanos através de produtos de origem animal e pelo ambiente (PRICE et al., 2007; GRAHAM et al., 2009; SMITH et al., 2013; BOECKEL et al., 2015).

A exposição repetida a doses baixas de agentes antimicrobianos pode propiciar condições ideais para a seleção e disseminação de cepas resistentes em animais (YOU & SILBERGELD, 2014). Os antimicrobianos adicionados às rações expõem a microbiota intestinal à múltiplas pressões, que atuam sobre uma série de mecanismos moleculares associados com o desenvolvimento de resistência (DAVIS et al., 2011). Há mais de cinquenta anos, Starr e Reynolds (1951) já alertavam que cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de microbiota intestinal de aves poedeiras, que recebiam estreptomicina na ração, apresentavam maior resistência à essa droga, quando comparado com animais não expostos. Com a utilização de métodos moleculares para a pesquisa de genes de resistência, mais estudos sobre esse assunto foram realizados e demonstraram que a microbiota de animais são reservatórios de patógenos resistentes; além disso, que os marcadores de resistência existentes podem ser transferidos para o ambiente e, conseqüentemente, para os humanos (HAMMERUM, 2012).

No presente estudo, demonstrou-se que *E. coli* isolada de lotes suínos, que receberam continuamente antimicrobianos via ração, apresentavam frequência de resistência e multirresistência maior em comparação com isolados de lotes não-medicados. O Grupo 1 do estudo era composto por lotes mantidos em condição experimental na Embrapa Suínos e Aves, ou seja, uma baixa densidade de animais alojados em sistema não-comercial. Os lotes alojados eram criados, desde 2008, sem a administração de antimicrobianos via ração. O Grupo 2, por sua vez, era composto por suínos originados dessa mesma unidade experimental e que passaram a receber pulsos de antimicrobianos de quatro classes distintas (polimixinas, tetraciclina, fenicóis e pleuromutilinas), como uma forma de simular a introdução de antimicrobianos em lotes não-medicados. A avaliação dos isolados de *E. coli* proveniente dos lotes de ambos os grupos apresentaram um perfil de resistência similar, caracterizado por um

maior número de isolados suscetíveis e frequência menor de resistência e multirresistência frente aos antimicrobianos testados (Tabela 16; Figura 9).

Esse resultado corrobora com as afirmações de que a redução, e até mesmo banimento, do uso de agentes antimicrobianos de forma não-terapêutica em animais de produção, leva à diminuição da resistência antimicrobiana (AGERSØ e AARESTRUP, 2013). Aarestrup (2012) afirma que a proibição do uso de antimicrobianos como promotor de crescimento e a redução do uso geral na produção animal é possível, sem causar danos para a produtividade e economia do setor. Entretanto, alguns autores são contrários a essa opinião. Em estudo realizado por Phillips (2007), foi demonstrado que, após a proibição do uso de promotores de crescimento na União Europeia, houve um aumento na frequência de resistências de cepas de *Enterococcus* à vancomicina e teicoplanina, além do aumento de *Campylobacter* resistente à macrolídeos, sugerindo assim, que o banimento de antimicrobianos em animais não diminuiria o risco de transmissão de cepas resistentes para humanos. Além disto, um incremento do uso terapêutico dos antimicrobianos foi observado nos anos subsequentes ao banimento do uso não-terapêutico, em virtude do aumento de doenças respiratórias e entéricas (AARESTRUP, 2015).

Chama atenção nos Grupos 1 e 2, o fato de 50% ou mais dos isolados de *E. coli* serem resistentes frente ao ácido nalidíxico, tetraciclina e sulfonamidas, sendo [NalSulTet] o perfil de resistência mais frequente nesses grupos (Tabela 16). Especificamente, no Grupo 1 que estava alojado em um sistema de produção que não administrava antimicrobianos há mais de cinco anos, seria esperado que a frequência de isolados resistentes frente a todos os antimicrobianos fosse inferior a esse índice. Entretanto, estudos demonstram que determinantes de resistência a antimicrobianos podem persistir durante muito tempo em bactérias presentes no ambiente, bem como podem ser co-selecionados com genes de resistência à outras substâncias como metais e desinfetantes.

Sengeløv et al. (2003) relataram a persistência de isolados resistentes por 300 dias após a aplicação de dejetos de suínos no solo. Ghosh e Lapara (2007) descreveram que bactérias resistentes carregadas por dejetos de suínos persistiram por mais de 18 meses no solo, podendo vir a contaminar a água superficial e subterrânea. Assim, resíduos podem ser uma importante fonte de disseminação de isolados resistentes para os microbiomas ambientais, podendo retornar aos animais confinados pela água, ar, fômites ou carregados por outros animais e vetores.

No ambiente da granja ou no intestino, isolados que carregam cassetes gênicos que incluem genes de resistência à desinfetantes e metais podem ser co-selecionados (BAKER-

AUSTIN et al., 2006). Geralmente, os metais administrados aos animais não são metabolizados e, assim, são excretados nas fezes (GARBARINO et al, 2003; JACKSON et al, 2003), que ao entrarem em contato com o ambiente podem selecionar bactérias resistentes. Já é comprovada a interação entre metais e antimicrobianos, em termos de co-seleção e co-transferência de resistência. McKinney e colaboradores (2010) observaram correlação positiva entre os genes *tet* e vários metais em um estudo conduzido em lagoas de dejetos de suínos. Zhu et al. (2013) observaram correlação entre genes de resistência e a presença de cobre em fezes e ambiente de uma granja de suínos. Em humanos, há evidência de que a exposição frente ao mercúrio aumenta a probabilidade de seleção de cepas de *E. coli* multirresistentes (SKURNIK et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que o gene *tcxB*, que confere resistência ao cobre, pode ser transferido por conjugação entre enterococos, juntamente com genes que codificam resistência à eritromicina, tetraciclina, vancomicina, ampicilina e gentamicina (HASMAN & AARESTRUP, 2005; AMACHAWADI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014). Da mesma forma, já foi relatada a co-seleção que cádmio e zinco exercem em isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, através de transferência horizontal de plasmídeos contendo genes de resistência, tanto para meticilina quanto cádmio e zinco (CAVACO et al., 2010). Estes resultados alertam para a necessidade de considerar a ação de outras substâncias na seleção de determinantes de resistência a antimicrobianos e sua disseminação.

Os resultados obtidos no Grupo 2 sugerem, ainda, que a mudança de perfil de resistência é um processo progressivo decorrente do uso continuado de antimicrobianos, uma vez que a administração de antimicrobianos à suínos que não recebiam rações medicadas não induziu a alteração imediata da frequência de resistência dos isolados de *E. coli*. Por outro lado, observa-se que houve um maior número de isolados com perfil [AmpCloFloTet] nesse grupo em relação ao Grupo 1, o que pode sugerir a co-seleção de isolados resistentes já presentes no intestino dos animais pela administração de pulso de florfenicol na terminação.

Ao contrário, os lotes dos Grupos 3 e 4 eram provenientes de granjas comerciais que utilizavam protocolos continuados de administração de antimicrobianos; portanto, havia exposição da microbiota por período que permitiria a seleção de bactérias resistentes. Esses grupos representaram o protocolo mais frequente no manejo de suínos no Brasil, onde diferentes princípios ativos de antimicrobianos são administrados ao longo de todas as fases zootécnicas. Os lotes do Grupo 3 receberam três pulsos de colistina e um pulso de lincomicina, ao passo que o Grupo 4 recebeu, alternadamente, antimicrobianos de seis classes distintas: fenicóis, quinolonas, polimixinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e pleuromutilinas.

Os isolados de *E. coli* provenientes das fezes dos animais do Grupo 4 apresentaram frequência de resistência mais elevada, maior concentração de isolados no grupo de maior número de marcadores fenotípicos de resistência (≥ 6) e ausência de isolados suscetíveis aos antimicrobianos. Os isolados do Grupo 3 ficaram numa posição intermediária entre os Grupos 1 e 2 e o Grupo 4 (Tabela 15, Figura 9). Os perfis de multirresistência mais encontrados em ambos os grupos incluíam antimicrobianos das classes β -lactâmicos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e aminoglicosídeos (Tabela 16), demonstrando um cenário distinto daquele encontrado nos Grupos 1 e 2. Chantziaras e colaboradores (2014) demonstraram forte correlação entre os níveis de consumo de oito classes de antimicrobianos e a prevalência de resistência aos antimicrobianos em *E. coli* de suínos, aves e bovinos. De forma semelhante, o grupo que foi exposto ao maior número de classes de antimicrobianos em nosso estudo (Grupo 4) apresentou frequência significativamente maior de resistência frente à maioria dos antimicrobianos testados em comparação com o Grupo 1 ou Grupo 2 (Tabela 15).

A evolução da resistência e multirresistência ao longo do tempo foi demonstrada em estudo retrospectivo conduzido em 1.729 isolados de *E. coli* de humanos e animais, isolados no período de 1950-2002 (TADESSE et al., 2012). Nesse estudo, foi demonstrado aumento significativo ($p < 0,001$) de resistência à ampicilina, sulfonamida e tetraciclina. A frequência de multirresistentes aumentou de 7,2% na década de 1950 para 63,6% durante os anos 2000. O fenótipo de co-resistência mais frequente foi tetraciclina e estreptomicina (29,7%), seguido por tetraciclina e sulfonamida (29,0%), indicando que esses determinantes de resistência eram capazes de se estabelecer e permanecer nas populações bacterianas ao longo do tempo. Em nosso estudo a co-resistência à tetraciclina e sulfonamida também foi frequentemente observada, corroborando com relatos em *E. coli* e *Salmonella* isolados de suínos no Brasil (SCHNEIDER et al., 2009; LOPES et al., 2015) e demonstrando que esses determinantes também foram selecionados na região.

Em virtude da importância dos β -lactâmicos para o tratamento de infecções severas em humanos, a pesquisa de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL tem adquirido importância nos programas de monitoramento de bactérias animais (EFSA, 2015). Por conta da sua relevância e da baixa frequência de ocorrência, a adoção de protocolos de enriquecimento seletivo e detecção em meio sólido seletivo e diferencial têm sido proposta (EFSA, 2015). No presente estudo, adotou-se tanto o enriquecimento seletivo de *E. coli* produtoras de ESBL, como a pesquisa de isolados resistentes no grupo de colônias típicas de *E. coli* obtidas do ágar EMB (protocolo não-seletivo).

Em relação ao protocolo seletivo, houve baixa recuperação de *E. coli* ESBL positiva. Entre as amostras de fezes obtidas de 279 animais, apenas 52 isolados foram confirmados como *E. coli* e 20 isolados foram positivos no teste confirmatório de ESBL preconizado pelo CLSI. O ágar *chromID ESBL*® tem como sua principal vantagem uma alta sensibilidade (97,7%) e uma boa especificidade (89%), o que permite a recuperação e identificação da maioria dos organismos produtores de ESBL (GLUPCZYNSKI et al., 2007). Entretanto, Färber et al. (2008) observaram que esse meio, apesar de apresentar sensibilidade elevada (95,8%), pode apresentar baixa especificidade (10,5%) em algumas situações. Nesse estudo, os resultados falso-positivos ocorreram em *Enterobacter* sp. e *E. coli* que apresentavam o gene *ampC* cromossômico ou plasmidial, o qual codifica a produção de uma β -lactamase distinta das ESBLs. A expressão de *ampC* é tipicamente associada com a resistência a todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenêmicos e cefepima. Em contraste com as ESBL, as enzimas codificadas por *ampC* não são afetadas pelos inibidores de β -lactamase. No que diz respeito ao meio de cultura *chromID ESBL*®, esse não é capaz de diferenciar a presença de enzimas ESBL e os mecanismos de resistência associados ao *ampC*, justificando a ocorrência de confundimento na identificação de colônias típicas (FARBER et al., 2008).

Entre os isolados obtidos do ágar EMB (sem seleção), testados frente à cefotaxima e cefotazidima (teste de triagem para ESBL) e, posteriormente, frente aos discos desses mesmos antimicrobianos associados ao ácido clavulânico (teste confirmatório para ESBL), também houve uma baixa frequência de isolados positivos. Entre esses isolados, apenas 20 confirmaram ser produtores de ESBL no teste fenotípico. Em ambos os casos, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos de origem dos isolados, sendo a maioria proveniente do Grupo 4. Em estudo anterior, um número relativamente baixo de isolados positivos também foi encontrado (JONES-DIAS et al., 2016). Porém, Hu e colaboradores (2013) observaram uma tendência de aumento da prevalência de produtores de ESBL em *E. coli* isolada de suínos saudáveis ao longo dos anos. Este aumento em isolados provenientes de suínos foi atribuído, pelos autores, ao aumento do uso de antimicrobianos na produção suína na China, principalmente de amoxicilina e quinolonas como promotores de crescimento. Da mesma forma, em estudo realizado em Portugal, as cepas produtoras de ESBL provenientes de fezes de suínos e de aves apresentaram resistência concomitante a antimicrobianos utilizados na produção animal, principalmente estreptomicina, sulfonamida e trimetoprima (MACHADO et al., 2008).

Se o perfil de resistência e multirresistência apresentado pelos isolados de *E. coli* apresentou diferença entre grupos, o mesmo não ocorreu na microbiota intestinal, que não

diferiu em ambas as análises feitas por sequenciamento de alto rendimento de duas regiões hipervariáveis distintas do gene 16S rRNA. Da mesma forma, a enumeração de *E. coli* por método de cultivo tradicional, não resultou em medianas diferentes entre grupos. Esses resultados diferem de estudos como de Danzeisen et al. (2011), Looft et al. (2012) e Kim et al. (2012). Looft e colaboradores (2012) descreveram que a exposição a doses subterapêuticas de clorotetraciclina, sulfametazina, e penicilina provocavam alterações na microbiota intestinal de suínos. Estas alterações incluíram aumento da prevalência de *Proteobacteria* (principalmente em *E. coli*) e na abundância e diversidade de genes específicos para resistência antimicrobiana. Entretanto, nesses estudos houve uma atenção especial no sequenciamento de amostras colhidas imediatamente após o uso de antimicrobianos. No presente estudo, as amostras foram colhidas em fases pré-determinadas e uniformes, uma vez que os protocolos de administração de antimicrobianos eram bastante diferentes entre os grupos. Neste sentido, podemos sugerir que, apesar de ocorrer a alteração na estrutura bacteriana logo após a administração de antimicrobianos via ração, como demonstrado por Looft et al. (2012), parece haver a tendência de recomposição da microbiota em curto espaço de tempo. É possível sugerir, também, que a recomposição no que se refere a *E. coli* exposta à antimicrobianos, ocorre com isolados carreando maior número de determinantes de resistência a antimicrobianos.

No sequenciamento realizado na plataforma MiSeq (Illumina), foi escolhida a região V1-V3, a qual apresenta tamanho de aproximadamente 540 bases, compatível com essa plataforma. As regiões V2 e V3 foram consideradas as mais eficazes para a identificação de gênero (CHAKEAVORTY et al., 2007), sendo a V3 classificada como altamente informativa (BAKER et al., 2003). Já a plataforma IonTorrent PGM, apesar de gerar resposta mais rápida, comporta leituras de fragmentos menores (até 400 pb); por isso, a região V5-V6 foi escolhida para análise. Essa região, por sua vez, tem sido muito utilizada em estudos de microbiota intestinal e oral de humanos (BAKER et al., 2003; ZAURA et al., 2005).

Apesar das duas plataformas estarem baseadas em princípios diferentes de sequenciamento e regiões hipervariáveis distintas terem sido sequenciadas, os resultados finais não apresentaram diferença estatística quanto à estrutura bacteriana da microbiota intestinal identificada. Nas duas plataformas, os filos mais frequentes foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, demonstrando serem característicos da microbiota intestinal de suínos, assim como demonstrado em outros estudos (LOOFT et al., 2012; MACH et al., 2015). Destes, *Firmicutes* compreende duas classes de bactérias Gram-positivas (*Clostridia* e *Bacilli*), que incluem constituintes majoritários da microbiota intestinal de humanos e animais. Já o filo

Bacteroidetes é composto por três grandes classes de bactérias Gram-negativas. Dentre elas, a classe *Bacteroides* inclui bactérias anaeróbias e não-esporuladas que habitam a cavidade oral, intestino e rúmen. Geralmente são benéficas ao hospedeiro, mas algumas espécies podem causar doenças (HOLT et al., 1994).

Em relação aos gêneros, apesar de também não haver diferença significativa entre os grupos identificados nas duas plataformas, foi observada variação na sua composição. Essa variabilidade já havia sido observada em estudos que sequenciaram diferentes regiões do gene 16S rRNA em amostras de microbiota intestinal de seres humanos (HAYASHI et al., 2003; HAYASHI et al., 2005). Da mesma forma, o método e condições de extração de DNA são apontadas como capazes de influenciar o resultado do sequenciamento (DELMONT et al., 2011). Entretanto, em nosso estudo, todas as amostras foram coletadas e mantidas sob as mesmas condições. Além disso, as extrações de DNA foram realizadas ao mesmo tempo, garantindo que esse viés não fosse introduzido.

Na plataforma Illumina, houve uma consistência maior nos resultados entre coletas e grupos, com predomínio dos gêneros *Prevotella* e *Oscillibacter*, seguidos de *Bacteroides* e *Lachnospiracea*. Na plataforma IonTorrent PGM, por sua vez, houve maior variabilidade entre grupos, porém sem diferença significativa. *Prevotella* também foi o gênero mais encontrado nos Grupos 2, 3 e 4. O Grupo 1, porém, apresentou uma maior frequência de *Bacteroides*. O terceiro gênero mais frequentemente encontrado foi *Lactobacillus* seguido de *Oscillibacter* (Figura 8).

O gênero *Prevotella* (pertencente ao filo *Bacteroidetes*) é considerado comensal e é identificado como um dos gêneros mais abundantes da microbiota intestinal suína (LESER et al., 2002; LAMENDELLA et al., 2011; LOOFT et al., 2012; MACH et al., 2015). É importante para saúde animal por metabolizar alimentos, fazendo com que os produtos finais de fermentação forneçam ao hospedeiro aporte energético (DUNCAN et al., 2004; FURUSAWA et al., 2013). Além disso, as ligações entre produtos de fermentação bacteriana e regulação de energia sugerem que ela melhore a eficiência alimentar. Em estudo com ratos alimentados com maior teor de fibras, foi observado aumento na população de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes*, resultando numa produção maior de acetato, propionato e butirato (DE VADDER et al., 2014). Apesar de *Prevotella* aumentar na presença de doses subterapêuticas de carbadox, Looft e colaboradores (2014) observaram que esta não é uma mudança absoluta, sugerindo que a microbiota se reorganiza após o uso de determinado antimicrobiano. Essa observação corrobora com nossa hipótese de que a microbiota intestinal

dos animais observados em nosso estudo sofreu recomposição, apesar do uso de antimicrobianos.

Já *Bacteroides* e *Oscillibacter* são gêneros que predominam em leitões e na microbiota gastrointestinal neonatal, já que os mesmos são adaptados à utilização de oligossacarídeos do leite como única fonte de carbono (MACH et al., 2015). A introdução de uma dieta sólida, que por sua vez pode modificar a disponibilidade do substrato e as condições fisiológicas do trato gastrointestinal (OPAPEJU et al., 2009; KIM et al., 2012), pode alterar o perfil bacteriano, como observado por Mach et al. (2015), em que houve aumento do número de *Prevotella*, *Acetivibrio*, *Oribacterium*, *Paraprevotella*, *Roseburia* e *Succinivibrio* após o desmame.

O gênero *Escherichia*, pertencente ao filo *Proteobacteria*, encontra-se entre os gêneros menos frequentes da microbiota intestinal. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, usualmente denominada de enterobactérias, é uma das bactérias mais estudadas e isoladas em laboratórios de bacteriologia (PRESCOTT et al., 2013). É parte da microbiota normal do cólon de humanos e animais, porém inclui linhagens patogênicas causadoras de importantes doenças. Além de ser indicador da contaminação fecal de água e alguns alimentos, atualmente tem sido adotada como indicador da seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos em animais e alimentos (EFSA, 2015). Nesse caso, o foco está relacionado à saúde pública, pela preocupação de que cepas resistentes possam chegar até os humanos pelo ambiente ou pela cadeia de produção de alimentos.

Com esse objetivo, isolados de *E. coli* de fezes suínas colhidas no pré-abate e de carcaças na etapa do pré-resfriamento, foram avaliadas quanto ao perfil de resistência, numa etapa independente do presente estudo, conduzida em três matadouros-frigoríficos. Os animais amostrados eram provenientes de granjas comerciais, portanto haviam sido expostos a protocolos de uso de antimicrobianos (ampicilina, ceftiofur, florfenicol, colistina e tiamulina) semelhantes aos administrados aos Grupos 3 e 4, como pode ser confirmado nas Guias de Transporte de Animais entregues junto com os lotes de abate.

Observou-se que a quase totalidade dos isolados (92,6%) de *E. coli* analisados apresentou fenótipo de resistência frente a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As maiores frequências de resistência foram encontradas frente à tetraciclina, ampicilina, sulfonamida, florfenicol e ácido nalidíxico, o que pode ser explicado pela pressão de seleção exercida pelo uso dos antimicrobianos, no caso de ampicilina e florfenicol, e possivelmente pela co-seleção de resistência nos demais casos.

A frequência de resistentes frente à ampicilina, florfenicol e tetraciclina foi significativamente maior no grupo de isolados de fezes do que de carcaças, entretanto a percentagem de isolados multirresistentes não apresentou diferença entre grupos de amostras ou matadouros-frigoríficos. Outros levantamentos de perfil de resistência também relataram frequências menores de isolados de *E. coli* resistentes a alguns antimicrobianos em carne suína do que em fezes de suínos (THORSTEINSDOTTIR et al., 2010; EFSA, 2012). Porém, diferenças na origem e época de coleta de cada tipo de amostra analisada podem ter influenciado nas frequências encontradas nesses estudos, dificultando a sua comparação. Alguns estudos sugerem que, ao longo do processo de abate, poderia ocorrer a substituição da microbiota original por isolados menos resistentes, os quais estariam presentes no ambiente do matadouro ou no intestino de suínos submetidos à menor pressão de uso de antimicrobianos (ASLAM et al., 2004; WU et al., 2009). Uma das hipóteses para explicar esse fato estaria relacionada à menor capacidade competitiva de isolados que carregam mutações e genes de resistência, quando na ausência da pressão seletiva dos antimicrobianos. Essa perda competitiva seria motivada pelo custo biológico de carrear esses genes suplementares (NAGAEY et al., 2001; DAHLBERG et al., 2003). Porém, outros estudos demonstraram que o impacto na eficiência metabólica de isolados carregando genes de resistência é muito baixo, não influenciando na sobrevivência de isolados resistentes (ENNE et al., 2005; HUMPHREY et al., 2012). Em relação ao abate, experimento conduzido por Delson e colaboradores (2010) em suínos inoculados pela via oral com uma cepa multirresistente de *E. coli* demonstrou que a mesma era capaz de sobreviver no ambiente do matadouro e ao processamento das carcaças, incluindo o resfriamento. Dessa forma, as evidências disponíveis não parecem ser suficientes para favorecer a hipótese de decréscimo de resistência na microbiota carregada em carcaças comparada com a encontrada no trato intestinal de animais abatidos.

Corroborando com isto, a análise de PFGE conduzida em isolados multirresistentes evidenciou que a maioria dos isolados originados de carcaça, em nosso estudo, era relacionada com aqueles de fezes colhidas na espera pré-abate. Nos três matadouros frigoríficos (A, B, C), a maioria dos isolados com perfil de multirresistência foi agrupada em dois a três grandes clusters com similaridade $\geq 70\%$, os quais incluíram isolados de fezes e carcaças. O fato dos isolados analisados nesse estudo serem epidemiologicamente relacionados, apresentarem o mesmo perfil de multirresistência e pertencerem a pulsotipos relacionados, demonstra que isolados multirresistentes carregados no trato intestinal dos suínos são capazes de chegar às carcaças. Algum grau de contaminação das carcaças com a microbiota intestinal é inevitável durante o processo de abate, sendo os programas de

autocontrole voltados para a manter a contaminação em níveis baixos, obedecendo parâmetros pré-estabelecidos. Dentro do processo de abate, a depilação é considerada uma etapa crítica, pois possibilita a transferência cruzada de bactérias entre carcaças (DE BUSSER et al., 2011). Mesmo após o controle pelo chuscamento, pode ocorrer a recontaminação pelo extravasamento de fezes durante a evisceração, não havendo medida de controle bacteriano posterior a essa etapa (EFSA, 2010). Com isto, carcaças carreando cepas multirresistentes podem entrar no processo de elaboração de produtos e chegar até o consumidor.

Os perfis fenotípicos de multirresistência mais prevalentes entre os isolados de *E. coli* de ambas as origens apresentaram co-resistência à tetraciclina, ampicilina e sulfonamidas, sugerindo que os genes de resistências podem estar localizados em elementos móveis comuns (PANTOZZI et al., 2010; THORSTEINSDOTTIR et al., 2010). Devido à alta frequência de resistência a esses princípios ativos, relatada na maioria dos estudos (MINYOUNG et al., 2014; MALIK et al., 2011), sugere-se que estejam agrupados em um cassete gênico. A ocorrência desses elementos genéticos em *E. coli* foi observado por Ajiboye e colaboradores (2009), que encontraram 28% de isolados de origem animal com a presença de integron classe 1, e 88% com cassetes gênicos. Como consequência, o uso terapêutico de qualquer uma das drogas mencionadas exerceria pressão seletiva sobre todo o cassete gênico, garantindo a manutenção do perfil de multirresistência na população bacteriana. Como marcador adicional do perfil de multirresistência mais prevalente [AmpFloNalSulTet], encontrou-se a resistência ao florfenicol e ao ácido nalidíxico. Chama atenção que perfil semelhante foi também o mais encontrado nos isolados de *E. coli* de fezes do Grupo 4 da terceira etapa do presente estudo. Esses resultados, obtidos em estudos independentes, permitem especular que perfis semelhantes de multirresistência são frequentes entre isolados de *E. coli* na cadeia produtiva de suínos, e podem, igualmente, ser detectados em carcaças.

As classes de antimicrobianos contra as quais foram encontrados isolados resistentes são prescritas na medicina humana para o tratamento de infecções urinárias, entéricas e respiratórias, inclusive aquelas causadas por *E. coli* (DONNENBER, 2010). Dos antimicrobianos testados, apenas o florfenicol não é utilizado na terapêutica humana, sendo a única molécula do grupo dos fenicóis que tem permissão para uso em programas preventivos e terapêuticos em suinocultura no Brasil (BARCELLOS et al., 2009). Entretanto, a resistência ao florfenicol em Gram-negativas é codificada pelo gene *floR*, o qual confere resistência cruzada ao cloranfenicol (DOUBLET et al., 2005), droga ainda usada no tratamento de algumas infecções humanas. Por tudo isso, a circulação e seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos na produção animal e sua liberação no meio ambiente constitui uma

preocupação, justificando as restrições ao uso de antimicrobianos que tem surgido em diversos países. Em especial, a entrada de bactérias resistentes aos antimicrobianos na cadeia de produção de alimentos tem merecido destaque nessa discussão, principalmente no que diz respeito à capacidade desses isolados de ultrapassar as barreiras representadas pelo processamento de produtos de origem animal e chegar ao consumidor.

Por essa razão, na segunda etapa do estudo, os isolados multirresistentes provenientes das carcaças na etapa de pré-resfriamento foram avaliados quanto à susceptibilidade a antimicrobianos adicionais e investigado para a presença de alguns genes de resistência. Uma grande variedade de perfis fenotípicos foi encontrada entre os 228 isolados; apesar disso, cada matadouro-frigorífico apresentou um perfil predominante. Enquanto nos matadouros-frigoríficos A e B foi observado o predomínio de perfil de resistência [AmpCloEstFloNaISulTetTri], incluindo todas classes de antimicrobianos testadas, exceto os nitrofuranos; no estabelecimento C predominaram quatro perfis com menor número de marcadores (Figura 3). Essa variação pode estar relacionada ao protocolo utilizado em cada agroindústria, incluindo maior ou menor uso de antimicrobianos, os quais selecionariam isolados que carregam genes distintos. Além disso, o teste dos isolados de carcaça frente aos antimicrobianos adicionais, resultou na inclusão de estreptomicina, cloranfenicol e trimetoprima nos perfis de resistência mais encontrados em todos os matadouros-frigoríficos, indicando que também essas resistências possam estar disseminadas na cadeia produtiva de suínos.

Vinte e sete isolados multirresistentes escolhidos com base no número e tipo de marcadores fenotípicos de resistência presentes foram investigados quanto à presença de genes anteriormente descritos em isolados resistentes de origem animal e humana. A diversidade de genes carregados por isolados multirresistentes de *E. coli* originados de suínos foi demonstrada por Frye e colaboradores (2011). Nesse estudo, no mínimo um e no máximo 60 genes diferentes foram detectados nos isolados testados. Entre os genes mais prevalentes figuraram os que codificam resistência frente à aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadB*, *aac(6)*, *strAB*), β -lactâmicos (*ampC*, *ampR*, *bla_{TEM}*, *bla₂*), inibidores da via metabólica do folato (*sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *dfh*), fenicóis (*cat*, *floR*) e tetraciclina (*tet(D)*, *tet(A)*, *tet(R)*). A partir disso, no presente estudo foram investigados 15 genes envolvidos na resistência frente aos antimicrobianos de cinco classes distintas, incluindo alguns dos mais frequentemente encontrados por Frye et al. (2011).

Entre os genes pesquisados, *bla_{PSE}*, *sul1*, *catA1*, *tetG*, *ant2* e *strB* não foram encontrados. A ausência do gene *sul1* é relevante, pois o mesmo é utilizado como marcador

de integrons do tipo 1, pois está presente na extremidade 3' desses elementos móveis. Por outro lado, a presença do gene *sul3*, encontrado em 26,6% dos isolados de nosso estudo, já foi detectado como parte do integron tipo 1 em *E. coli* (WU et al., 2010), portanto não é possível excluir a presença de integrons do tipo 1 nesses isolados. Em relação aos isolados resistentes à sulfonamida, *sul2* foi o gene mais frequentemente identificado, concordando com o encontrado em outros estudos (HAMMERUM et al., 2006; TROBOS et al., 2009; WU et al., 2010).

Situação contrária foi identificada em três isolados que carregavam, o gene *tet* ou *bla_{TEM}*, mas não expressavam o fenótipo de resistência. Nestes casos, a presença do gene indica resistência, e pode estar relacionada com aumento da Concentração Inibitória Mínima até níveis que ainda não alcançam os limites estabelecidos pelo CLSI para considerar um isolado clinicamente resistente, critério utilizado em nossa análise.

Em relação à tetraciclina, resistência fenotípica mais comum entre isolados do presente estudo, dois genes foram detectados – *tetA* e *tetB*, sendo o primeiro deles o mais frequente. Este resultado concorda com outros estudos que relatam que os genes mais encontrados em isolados de suínos são *tetA* e *tetB* (GUERRA et al., 2003; BOERLIN et al., 2005; ROSENGREN et al., 2009). Em sete isolados a presença concomitante dos dois genes foi observada, o que já foi descrito anteriormente e demonstra a possibilidade de inclusão e seleção de determinantes de resistência codificando mecanismos de resistência similares em elementos genéticos móveis (MAYNARD et al., 2003).

Entre os aminoglicosídeos, foram testados seis antimicrobianos distintos nessa etapa do estudo. Os fenótipos de resistência mais encontrados foram estreptomicina (65,8%) e canamicina (32%), porém houve uma grande variabilidade de combinações de perfis para os antimicrobianos dessa classe. Isso se deve, principalmente, ao fato de que o mecanismo de resistência a esses antimicrobianos está relacionado a enzimas codificadas por genes distintos, mas que tem a capacidade de modificar e tornar inativo mais de um antimicrobiano dessa classe. Um único gene pode conferir resistência a até 12 aminoglicosídeos distintos (ARSG, 1995), podendo haver, porém, diferente nível de atividade das enzimas codificadas pelos substratos. Esse fato leva ao aparecimento de diferentes perfis fenotípicos com a presença de um mesmo gene. A presença de isolados com fenótipo de resistência à aminoglicosídeos, mas sem detecção dos genes pesquisados, por outro lado, justifica-se pelo fato de que nem todos os genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos foram pesquisadas nesse estudo.

Entre os genes pesquisados, *strA* foi o mais frequente, e confere resistência à estreptomicina. A presença concomitante dos genes *strA* e *strB* tem sido relatada (BOERLIN et al., 2005; SUNDE et al., 2005), porém nos isolados analisados o gene *strB* não pode ser identificado. Já o gene *aac(3)IV*, que confere resistência à gentamicina, tobramicina e netilmicina foi encontrado em 16 isolados que apresentavam esse perfil fenotípico em diferentes combinações. Este gene é comumente encontrado em bactérias isoladas a partir de humanos (SAENZ et al., 2004), resultado que torna relevante sua presença em isolados de *E. coli* provenientes de carcaças suínas. Em relação à canamicina, 12 isolados apresentaram resistência fenotípica e presença do gene *aph(3)Ia*, que confere resistência a essa droga, assim como para neomicina (MAYNARD et al., 2003; ZHANG et al., 2007), aminoglicosídeo que não foi testado em nosso estudo.

Dos 21 isolados que apresentaram resistência fenotípica tanto para florfenicol quanto cloranfenicol, em 16 foi encontrado o gene *floR*, que codifica uma bomba de efluxo que exporta ambos os antimicrobianos para fora da célula bacteriana (VAN HOEK et al., 2011). Apesar da proibição do uso de cloranfenicol na produção de suínos, o uso de florfenicol seleciona esse gene, que propicia que a resistência ao cloranfenicol não desapareça da população bacteriana. Em sete isolados, nenhum dos genes pesquisados foi detectado. Apenas o gene *floR* é relacionado com a resistência ao florfenicol/cloranfenicol, portanto a amplificação desse gene seria esperada. Uma possível hipótese, que ainda precisa ser investigada, é a super-expressão de bombas de efluxo existentes na célula bacteriana e que exportam inespecificamente diversas substâncias tóxicas, inclusive os antimicrobianos. Essa expressão aumentada já foi encontrada em isolados clínicos de *E. coli* sob forma de biofilmes, os quais eram capazes de exportar diversos antimicrobianos, inclusive o florfenicol (FERNANDES et al., 2003; SOTO, 2013).

Os 27 isolados escolhidos para pesquisa de genes de resistência foram também caracterizados por PFGE, como forma de avaliar se constituíam grupos clonais multirresistentes que estavam sendo disseminados entre carcaças. Observou-se uma alta diversidade de pulsotipos entre os isolados, característica que já havia sido observada em *E. coli* em outros estudos. No matadouro-frigorífico A não foi identificado nenhum grupo de isolados relacionados, os quais também não apresentaram perfil de resistência comum. Por outro lado grupos relacionados e apresentando perfil de resistência em comum foram identificados em B e C. Em B, quatro isolados relacionados, com genótipo *sul2*, *tetA*, *tetB*, *floR*, *strA*, *aph(3)Ia* e *aac(3)IV* foi identificado. Em C, houve um perfil genotípico comum (*sul3*, *tetB*, *strA*, *aac(3)IV*) identificado em isolados relacionados. Finalmente um terceiro

grupo de isolados com similaridade $\geq 70\%$ pode ser formado, incluindo isolados do matadouro-frigorífico C que apresentavam genótipo de resistência distinto e dois isolados do estabelecimento B. A presença de isolados relacionados, com genótipo de resistência comum provenientes de carcaças distintas evidencia que a disseminação dessas cepas ocorre no abatedouro.

No presente estudo apenas genes de resistência adquiridos foram investigados, sendo os mecanismos causados por mutações apenas caracterizados fenotipicamente. Foi o caso das quinolonas, onde mutações nas enzimas DNA-girase (frequentemente associada ao gene *gyrA*) e topoisomeres IV (associados aos genes *parC* e *parE*) são os principais mecanismos de resistência (JACOBY, 2005). Todos os isolados que apresentaram fenótipo de resistência ao ácido nalídixico (75,9% do total de isolados) foram investigados quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ciprofloxacina. Destes isolados, 17,4% já apresentavam resistência à essa fluoroquinolona, de acordo com os pontos de corte clínicos do CLSI. Entretanto, na União Europeia uma abordagem distinta vem sendo adotada para a análise de isolados não-clínicos: a determinação de um ponto de corte ecológico, o qual expressa o desvio de um grupo de isolados em relação a população selvagem (*wild type*). O valor dessa análise é estudar a tendência dos valores de CIM de uma população, uma vez que a resistência é um processo progressivo, caracterizado pelo aumento da tolerância a concentrações crescentes do antimicrobiano (EFSA, 2015). Adotando essa estratégia, verifica-se que 95,9% dos isolados apresentaram valores de CIM fora daqueles da população selvagem, indicando assim que já adquiriram algum grau de resistência. No caso das quinolonas, sabe-se que mutações cumulativas vão ocorrendo, determinando que um isolado apresente primeiro resistência ao ácido nalídixico e posteriormente às fluoroquinolonas (HOOPER, 2001). Sabe-se que as quinolonas são amplamente utilizadas na produção de suínos, principalmente no controle de infecções do trato urinário; as fluoroquinolonas, por sua vez, são drogas de eleição em humanos para o tratamento de cistites causadas por *E. coli* e são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes à outras classes de fármacos (SOUZA, 2005). Na União Europeia, de acordo com o relatório emitido pela EFSA (2015) sobre resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de humanos, animais e alimentos, a resistência encontrada ao ácido nalídixico e ciprofloxacina permanecia baixa: 6,1% e 3,8%, respectivamente. A diferença de frequências de resistência em nossos isolados está, provavelmente, relacionada ao uso extensivo das quinolonas em nosso país e constitui um aspecto preocupante.

É aceito, e foi evidenciado em nosso estudo, que o uso de antimicrobianos na criação de suínos gera uma pressão seletiva, resultando em cepas multirresistentes que podem contribuir para a propagação desses genes no ambiente e na cadeia de produção de alimentos (SENGELØV et al., 2003; BUROW et al., 2014). Diferentes protocolos de administração de antimicrobianos entre regiões e agroindústrias são comuns e acabam influenciando na seleção (WANG et al., 2010; BUROW et al., 2014; CHANTZIARAS et al., 2015), justificando as diferenças de perfis de resistência encontradas na microbiota patogênica e comensal.

Considerando os perfis de resistência encontrados em *E. coli* originada de carcaças suínas e fezes, em todas as etapas deste trabalho, observa-se que essas cepas são selecionadas na granja pelo uso de antimicrobianos, chegam ao pré-abate, podem ser disseminadas na linha de abate, e contaminam a carcaça. Além de uma questão de inocuidade dos alimentos, a resistência bacteriana tem um componente de impacto ambiental, como demonstrado em fontes hídricas superficiais em áreas de produção suína de Santa Catarina (PALHARES et al., 2014). Até mesmo um componente de segurança ocupacional pode estar envolvido, pois indivíduos que trabalham em contato com aves ou suínos nas granjas e em matadouros-frigoríficos demonstraram ter maior chance de serem colonizados por cepas comensais de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos (PRICE et al., 2007; ALALI et al., 2010). Independente da via em que alcançam os humanos, a principal preocupação no que diz respeito à presença de bactérias multirresistentes, é a chance das mesmas colonizarem, multiplicarem e transferirem elementos genéticos móveis, alterando o perfil de resistência da microbiota intestinal humana, como já demonstrado (APLEY et al., 2001; DZEDIC et al., 2008).

O abandono total do uso de antimicrobianos é um assunto controverso (BLAHA, 2011), pelo impacto econômico que gera e pela ausência de comprovação de que resultará no desaparecimento de bactérias multirresistentes em animais, gerando impacto também na população humana. Os mecanismos de seleção por substâncias não-antibióticas como metais e desinfetantes é outro fator a ser considerado nesse cenário. Entretanto, o uso excessivo de princípios ativos importantes para o tratamento humano - como alguns aminoglicosídeos, quinolonas e cefalosporinas - deve ser discutido pela cadeia produtiva de suínos. O conceito de uso prudente de antimicrobianos é amplamente citado em toda a literatura científica veterinária e, conforme nossos resultados demonstraram, deve ser incluída entre as metas da suinocultura brasileira.

7. CONCLUSÕES

- *Escherichia coli* carregada em fezes de suínos no pré-abate e em carcaças apresentam alta frequência de resistência e multirresistência a antimicrobianos utilizados tanto em medicina veterinária quanto em medicina humana.
- Isolados multirresistentes de *E. coli* originados de fezes e carcaças estão relacionados, demonstrando que há disseminação desses grupos clonais entre fezes e carcaças.
- As carcaças podem carrear *E. coli* com perfil multirresistentes e com genótipos semelhantes aos encontrados em isolados resistentes de humanos.
- Carcaças distintas podem carrear isolados de *E. coli* multirresistentes relacionados e com genótipos de resistência em comum, demonstrando a contaminação cruzada durante o processamento.
- O uso de protocolos que incluem a administração continuada de grande número de antimicrobianos via ração determina maior frequência de isolados de *E. coli* resistentes e multirresistentes na microbiota intestinal em comparação com suínos criados sem antimicrobianos na ração.
- Os perfis de filos e gêneros bacterianos da microbiota entérica são similares nos grupos que recebem antimicrobianos e naqueles não medicados, indicando que se há alguma alteração, essa é transitória.
- Protocolos de uso prudente de antimicrobianos devem ser discutidos e adotados pela cadeia produtiva de suínos brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. Integrating genome-based informatics to modernize global disease monitoring, information sharing, and responde. *Emerg. Infect. Disease*, v. 18, 2012.

AARESTRUP. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 370. p. 1-13, 2015.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual. 2015.

AGERSØ, Y.; AARESTRUP, F. M. Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 569-572, 2013.

AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O.; LEE, B.; DEBROY, C.; RILEY, L. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clinical Infections Diseases*, v. 49, p.365-371, 2009.

ALALI, W. Q.; SCOTT, H. M.; NORBY, B. Assessing the similarity of antimicrobial resistance phenotypes among fecal *Escherichia coli* isolates from two aggregated occupational cohorts of humans versus swine using cluster analysis and multivariate statistics. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 94, n. 1-2, p. 77-83, Apr, 2010.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 251-259, 2010.

ALLEN, H. K.; LEVINE, U. Y.; LOOFT, T.; BANDRICK, M.; CASEY, T. A. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 114-119, 2013.

ALLEN, H. K.; LOOFT, T.; BAYLES, D. O.; HUMPHREY, S.; LEVINE, U. Y.; ALT, D.; STANTON, T. B. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *MBio*, v. 2, n. 6, p. 1110-1128, 2011.

ALLEN, H. K.; TRACHSEL, J.; LOOFT, T.; CASEY, T. Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. p. 91-100, 2014.

AMACHAWADI, R. G.; SCOTT, H. M.; ALVARADO, C. A.; MAININI, T. R.; VINASCO, J.; DROUILLARD, J. S. Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of US feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Appl. Environ. Microb.* 79, 4369–4375, 2013

- APLEY, M. D.; BROWN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J.; FERENC, S.; HOUSE, J. K.; RIVIERE, J. E.; RICE, L. B.; THORNSBERRY, C.; WADDELL, J. Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public perspectives. *JAVMA*, v. 212, p. 1209-1213, 2001.
- ARSG - The Aminoglycoside Resistance Study Groups. The Most Frequently Occurring Aminoglycoside Resistance Mechanisms - Combined Results of Surveys in Eight Regions of the World. *J. Chemother*, v. 7, p. 17-30, 1995.
- ASLAM, M.; GREER, G.; NATTRESS, F.; GILL, C.; McMULLEN, L. Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef-packing plant. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 78-86, 2004.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, v. 9, n. 3, p. 142-156, 2006.
- BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; CORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, v. 307, p. 1915-1920, 2005.
- BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primer. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, p. 541-555, 2003.
- BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; McARTHUR, J. V. Coselection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* v. 14, p. 176-182, 2006.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B.; MORES, T.; COELHO, C.; BOROWSKI, S. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. *Acta Scientiae Veterinarieae*, v. 37, p. s151-s155, 2009.
- BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chemical Biology*, Washington; v.8, n.1, p.105-115, 2013.
- BEN SALLEM, R.; BEN SLAMA, K.; SÁENZ, Y.; ROJO-BEZARES, B.; ESTEPA, V.; JOUINI, A.; GHARSA, H.; KLIBI, N.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* Isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, Larchmont; v. 9, n. 12, p. 1137-1142, 2012.
- BLAHA, T. The use of antimicrobial substances in food animals: the big picture. In: 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork, 2011, Maastricht, Anais, v. 1, p. 131-133, 2011.
- BOECKEL, T.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food. *PNAS*, v. 112, n. 18, p5649-5654, 2015.
- BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C.; REID-SMITH, R.; LIM, N. J.; NICHOLSON, V.; McEWEN, S.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M. Antimicrobial Resistance and Virulence genes of *Escherichia coli* isolates from Swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 1, 2005.

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

BRASIL. Instrução Normativa N° 08, de 29 de abril de 2010. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa n° 14 de 17 de maio de 2012. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2012.

BRASIL. Instrução Normativa n° 35 de 14 de novembro de 2005. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2005.

BRASIL. Instrução Normativa N°26/2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2009.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 1999.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA 65/2006. Regulamento técnico sobre os procedimentos para a fabricação e o emprego de rações, suplementos, premixes, núcleos ou concentrados com medicamentos para os animais de produção. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2006.

BRASIL. Manual de Procedimentos. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – PREBAF. ANVISA, 2004.

BRASIL. Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococcus e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – PREBAF. ANVISA, 2008.

BRASIL. Resolução - RDC n° 243. Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMvet. Disponível em: www.agricultura.gov.br. 2003.

BUROW, E.; SIMONEIT, C.; TENHAGEN, B. A.; KÄSBOHRER, A. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – A systematic review. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 113, p. 364-375, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1211–1233, 1995.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* v. 16, p. 175-188, 2003.

BYARUGABA, D. K. Mechanisms of antibiotic resistance. In: SOSA, A. J.; BYARUGABA, D. K.; AMÁBILE-CUEVAS, C.; HSUEH, P.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. N. *Antimicrobial resistance in developing countries*. Springer. Cap. 2, p. 15-26, 2010.

- CAC. Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance CAC/GL 77 – 2011.
- CALVEYRA, J. C.; NOGUEIRA, M.G.; KICH, J.D.; BIESUS, L. L.; VIZZOTTO, R.; BERNO, L.; COLDEBELLA, A.; LOPES, L.; MORÉS, N.; LIMA, G. J. M. M.; CARDOSO, M. Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on excretion of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected growing pigs. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 46-57, 2011.
- CAMPOS, T. ; PISSETTI, C. ; WERLANG, G. O. ; LOPES, G. V. ; KICH, J. ; CARDOSO, M. . Antimicrobial Resistance of Enterococcus Isolated from Pre-Chill Swine Carcasses. *Acta Scientiae Veterinariae (Online)* ^{JCR}, v. 43, p. 1259, 2015.
- CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne; v. 3, n. 110, 2012.
- CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington; v.52, n.10, p.3801-3804, oct. 2008.
- CAVACO, L. M.; ABATIH, E.; AARESTRUP, F. M.; GUARDABASSI, L. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 10, p. 3612-3616, 2008.
- CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; STEGGER, M.; ANDERSEN, P. S.; SKOV, R.; FLUIT, A.C.; ITO, T.; AARESTRUP, F. M. Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 9, p. 3605-8, 2010.
- CDC. Center of Disease Control. PulseNet Protocols. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2013.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007.
- CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 827-834, 2014.
- CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; COLLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrobial Chemother*, v. 69, p. 827-834, 2015.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n, 2, p. 232-260, 2001.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard – 3. ed. CLSI/NCCLS M31-A3, 2008.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational supplement, CLSI M100-S22, volume 32, nº 3, 2012.

COSTA, M. M.; DRESCHER, G.; MABONI, F.; WEBER, S. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, I. S.; VARGAS, A. C. Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 1, p. 30-36, 2010.

COUTURIER, M.; BEX, F.; BERGQUIST, P. L.; MAAS, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 52, n. 3, p. 375-395, 1988.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, Edinburgh; v. 303, n. 6-7, p. 305-317, 2013.

DANZEISEN, J. L.; KIM, H. B.; ISAACSON, R. E.; TU, Z. J.; JOHNSON, T. J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE*, v. 6, 2011

DAVIS, M. F.; SILBERGELD, E.; PRICE, L. B.; LIU, C. M.-H. An ecological perspective on U.S. industrial poultry production: the role of anthropogenic ecosystems on the emergence of drug-resistant bacteria from agricultural environments. *Curr. Opin. Microbiol*, v. 14, p. 244–250, 2011.

DE BUSSER, E. V.; MAES, D.; HOUF, K.; DEWULF, J.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, S.; DE ZUTTER, L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, n. 1, p. 279-286, 2011.

DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; GONCALVES, G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, v. 156, n. 1-2, p. 84–96, 2014.

DELMONT, T.O., ROBE, P., CLARK, I., SIMONET, P., VOGEL, T.M. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods*. 86(3):397-400. 2011.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. L.; RELMAN, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, v. 6, n. 11, p. 2383-2400, 2008.

DIKMEVIUS. Antimicrobial resistance in food-producing animals of public health concern. An overview of the current situation and options for control. In: 9th International conference on the epidemiology and control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork, 2011, Maastricht, Proceedings, v. 1, p. 91, 2011.

DOUBLET, B.; SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; CLOECKAR, A. Florfenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 45, n. 5, p. 2106-2108, 2005.

DUNCAN, S. H.; RICHARDSON, A. J.; KAUL, P.; HOLMES, R. P.; ALLISON, M. J.; STEWART, C. S. *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3841-3847, 2002.

DUTIL, L.; IRWIN, R.; FINLEY, R.; NG, L. K.; AVERY, B.; BOERLIN, P.; BOURGAULT, A.; COLE, L.; DAIGNAULT, D.; DESRUISSEAU, A.; DEMCZUK, W.; HOANG, L.; HORSMAN, G. B.; ISMAIL, J.; JAMIESON, F.; MAKI, A.; PACAGNELLA, A.; PILLAI, D. R. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, p. 48-54, 2010.

ECDC/EFSA/EMA, ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. 114p. 2015

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EFSA. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 2015, 178p. 2015.

EFSA. Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in slaughter and Breeder pigs: Final Report. *EFSA Journal* 2010, 437p. 2010.

EFSA. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 2012. 233p. 2012

FÄRBER, J.; MODER, K.; LAYER, F.; TAMMER, I.; KONIG, W.; KONIG, B. Extended-spectrum beta-lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, p. 3721-3727, 2008.

FDA. (U.S. Food and Drug Administration). Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. 2010.

FERBER, D. Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science*, p. 301:1027, 2003.

FERNANDES, P.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J.M. Solvent tolerance in bacteria: Role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 22, p. 211-216, 2003.

FERRONATTO, A. I.; PELLEGRINI, D. C. P.; GUERRA, P.; CARDOSO, M.R.I. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos. *Archives of Veterinary Science*, v. 17, p. 42, 2012.

FISCHER, J.; HILLE, K.; MELLMANN, A.; SCHAUMBURG, F.; KREIENBROCK, L.; KOCK, R. Low-level antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from the nares of pigs –exposed persons. *Epidemiol. Infections*, v. 144, p. 686-690, 2016.

FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and

Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 633-641, 2000.

FRYE, J.; LINDSEY, R.; MEINERSMANN, R.; BERRANG, M.; JACKSON, C.; ENGLER, M.; TURPIN, J.; FEDORKA-CRAY, P. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 6, p. 663-679, 2011.

FURUSAWA, Y.; OBATA, Y.; FUKUDA, S.; ENDO, T. A.; NAKATO, G.; TAKAHASHI, D. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* v. 504, p. 446–450, 2013

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Protection*, v. 141, p. 525-528, 2010.

GALLOIS, M.; ROTHKÖTTER, H. J.; BAILEY, M.; STOKES, C. R.; OSWALD, I. P. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role?. *Animal*, v.3, n. 12, p. 1644-1661, 2009.

GARBARINO, J. R.; BEDNAR, A. J.; RUTHERFORD, D. W.; BEYER, R. S.; WERSHAW, R. L. Environmental fate of roxarsone in poultry litter. I. Degradation of roxarsone during composting. *Environ. Sci. Technol*, v. 37, p. 1509–1514, 2003.

GARMENDIA, L.; HERNANDEZ, A.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ, J. L. Metagenomics and antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 27-21, 2012.

GEBREYES, W. A.; DAVIES, P. R.; TURKSON, P. K.; MORROW, W. E.; FUNK, J. A.; ALTIER, C.; THAKUR, S. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 4, p. 698-705, 2004.

GEBREYES, W. A.; THAKUR, S.; MORROW, W. E. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 4, p. 765-768, 2005.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J.* v. 1, p. 191–203, 2007.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 591-606, 2008.

GLUPCZYNSKI, Y.; BERHIN, C.; BAURAIN, C.; BOGAERTS, P. Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 501–505, 2007.

GRAHAM, J. P.; SILBERGELD, E.; PRICE, L. B.; EVANS, S. L.; GRACZYK, T. K. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Sci. Total Environ*, v. 407, p. 2701–2710, 2009.

GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 6, p. 1022–1024, 2003.

GRIMM, V.; EZAKI, S.; SUSAN, M.; KNABBE, C.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM β -lactamases that confer resistance. *Journal of Clinical Microbiology*; v.42, n.8, p.3766-3774, 2004.

GUARDABASSI, L.; COURVALIN, P. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: AARESTRUP, F. M. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washington D.C.: ASM Press, p. 1-18, 2006.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. *Guia de antimicrobianos em Veterinária*. Porto Alegre: Arned, 267 p., 2010.

GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; LEHMAN, S.; HELMUTH, R. Phenotypic and genotypic characterization of Antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine, and poultry. *J. Antimicrob. Chemother*, v. 52 p. 489-492, 2003.

GUERRA, P. R.; FERRAZ, S.; CAMPOS, T.; CARDOSO, M. Perfil de resistência a antimicrobianos e avaliação da presença de grupos clonais em isolados de *Salmonella* Bredeney de linfonodos submandibulares de suínos e matéria-prima para fabricação de embutidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, p. 996, 1-6, 2011.

HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect*, v. 18, p. 619-625, 2012.

HAMMERUM, A.M.; SANDVANG, D.; ANDERSEN, S.R.; SEYFARTH, A. M; PORSBO, L.J.; FRIMODT-MØLLER, N.; HEUER, O.E. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol*, v. 106, n. 2, o. 235-237, 2005.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: What have we learned? *Animal Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 129-147, 2002.

HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M. Relationship between Copper, Glycopeptide and Macrolide Resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from Pigs in Denmark between 1997 and 2003. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 49, n. 1, 2005.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*, v. 11, p. 1093-101, 2005.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol*, v. 47, n. 8, p. 557-570, 2003.

HILL, D. A.; HOFFMANN, C.; ABT, M. C.; DU, Y.; KOBULEY, D.; KIRN, T. J.; BUSHMAN, F. D.; ARTIS, D. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Nature*, v. 3, n. 2, p. 148-158, 2010.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNATH, P. H. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. Ed. Williams & Wilkims, 787p., 1994.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, v. 292, p. 1115-1118, 2001.

HOOPER, L. V.; WONG, M. H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P. G.; GORDON, J. I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, v. 291, p. 881-884, 2001.

HU, Y.-Y.; CAI, J.C.; ZHOU, H.W.; CHI, D.; ZHANG, X.F.; CHEN, W.-L.; CHEN, G.X. Molecular Typing of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 19, p. 5988–5996, 2013.

JACKSON, B. P.; BERTSCH, P. M.; CABRERA, M. L.; CAMBERATO, J. J.; CAMBERATO, J. J.; SEAMAN, J. C., et al. Trace element speciation in poultry litter. *J. Environ. Qual.*, v. 32, p. 535–540, 2003.

JACOBY, G. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. 120-126, 2005.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington; v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JENSEN, V.F.; JAKOBSEN, L.; EMBORG, H. D. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy*, v. 58, p. 101-107, 2006.

JONES-DIAS, D.; MANAGEIRO, V.; FRANCISCO, A. P.; MARTINS, A. P.; DOMINGUES, G.; LOURO, D.; FERREIRA, E.; CANIÇA, M. Assessing the molecular basis of transferable quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals and food products. *Veterinary Microbiology*, v. 167, p. 523-531, 2013.

JONES-DIAS, D.; MANAGEIRO, V.; MARTINS, A. P.; FERREIRA, E. CANIÇA, M. New class 2 Integron in2-4 among Incl 1-Positive *Escherichia coli* isolates carrying ESBL and PMAb Genes from food animals in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.13, n. 1, p.36-40, 2016.

KADLEC, K.; KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy*, v. 59, p. 191-196, 2007.

KARRIKER, L. A.; COETZEE, J.; FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. *Diseases of Swine*. Ames, IA: Wiley-Blackwell, p. 106-118, 2012.

KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 205, p. 283-290, 2001.

KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S.; JACOBSEN, L.; HANSEN, L. H.; VESTER, B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503; *Molecular Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 1064-1073, 2005.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 307-313, 2011.

KIKUVI, G. M.; SCHWARZ, S.; OMBUI, J. N.; MITEMA, E. S.; KEHRENBERG, C. Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microbial Drug Resistance*, v. 13, p. 62-68, 2007.

KIM, H.B.; BOREWICZ, K.; WHITE, B.A.; SINGER, R.S.; SREEVATSAN, S.; TU, Z.J.; ISAACSON, R.E. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 109, p. 15485–15490, 2013.

LAMENDELLA, R.; DOMINGO, J. W. S.; GHOSH, S.; MARTINSON, J.; OERTHER, D. B. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 103, p. 1-17, 2011.

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M.; MOLLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 673-690, 2002.

LEVERSTEIN, M. A.; DIERIKX, C. M.; COHEN STUART, J.; VOETS, G. M.; VAN DEN MUNCKHOF, M. P.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; PLATTEEL, T.; FLUIT, A. C.; VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N.; SCHARINGA, J.; BONTEN, M. J.; MEVIUS, D. J. National ESBL surveillance group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 6, p. 873-880, 2011.

LI, P.; WU, D.; LIU, K.; SUOLANG, S.; HE, T.; LIU, X.; WU, C.; WANG, Y.; LIN, D. Investigation of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolated from Tivetan pigs. *Plos One*, v. 9, n. 4, p. e95623, 2014.

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T. M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A. P.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SCHUEPBACH-REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infections Diseases*; v. 56, n. 7, p. 1030-1037, 2013.

LOOFT T.; ALLEN, H. K. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut. Microb*, v.3, p. 463–467, 2012.

LOOFT, T.; ALLEN, H. K.; CASEY, T.; ALT, D.; STANTON, T. Carbadox has both temporary and lasting effects on the swine gut microbiota. *Front Microbiol*, v. 5, 2014.

- LOOFT, T.; JOHSON, T. A.; ALLEN, H. K.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; STEDTFELD, R. D.; SUL, W. J.; STEDFELD, T.; CHAI, B.; COLE, J. R.; HASHSHAM, S. A.; TIEDJE, J. M.; STANTON, T. B. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedures of the National Academy of Science USA*, v. 109, p. 1691-1696, 2012.
- LOPES, G. V.; PISSETTI, C.; PELLEGRINI, D.; SILVA, L.; CARDOSO, M. Resistance phenotypes and genotypes os *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from feed, pigs, and carcasses in Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 78, n. 2, p. 407-413, 2015.
- MACH, N.; BERRI, M.; ESTELLÉ, J.; LEVENEZ, F.; LEMONNIER, G.; DENIS, C.; LEPLAT, J. J.; CHEVALEYRE, C.; BILLON, Y.; DORÉ, J. ROGEL-GAILLARD, C.; LEPAGE, P. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiologu Reports*, v. 7, p. 554-569, 2015.
- MACHADO, E.; COQUE T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. P. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother*, v. 62, p. 296–302, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1128p., 2010.
- MAHROUKI, S.; BELHADJ, O.; CHIH, H.; MOHAMED, B. M.; CELENZA, G.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Chromosomal bla_{CTX-M-15} associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. *Journal of Medical Microbiology*; v. 61, p. 1286-1289, 2012.
- MAYNARD, C.; FAIRBROTHER, J.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIÈRE, S.; HAREL, J. Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 10, p. 3214-3221, 2003.
- McKinney, C.; Loftin, K.; MEYER, M.; DAVIS, J.; PRUDEN, A. tet and sul Antibiotic Resistance Genes in Livestock Lagoons of Various Operation Type, Configuration, and Antibiotic Occurrence. *Environmental Science Techonology*, v. 44, n. 16, p. 6102-6109, 2010.
- MELO, D.; MENEZES, A.; REIS, J.; GUIMARÃES, A. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1165-1170, 2015.
- MILLET, S. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *The Veterinary Journal*, in press, 2010.
- MINYOUNG, L.; EUNJU, S., YEONHEE, L. Antimicrobial Resistance and Integron Profiles in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 11, n. 12, p. 988-997, 2014
- MISSOTTEN, J. A.; MICHIELS, J.; OVYN, A.; DE SMET, S.; DIERICK, N. A. Fermented liquid feed for pigs. *Archives of Animal Nutrition*, v. 64, n. 6, p. 437-466, 2010.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*, v. 20, p. 191-195, 2009.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 59, p. 695–700, 1993.

NG, L. K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, p. 209-215, 2001.

NOGUEIRA, M. G.; CALVEYRA, J.; KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; CARDOSO, M. Efeito de probiótico na infecção e excreção fecal de Salmonella em suínos. *Ciência Rural*, v. 42, p. 514-519, 2012.

OPAPEJU, F.O.; KRAUSE, D.O.; PAYNE, R.L.; RADEMACHER, M.; NYACHOTI, C.M. Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *J Anim Sci*, v. 87, p. 2635–2643, 2009.

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

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p. 1-11, 2012.

PANTOZZI, F. L.; MOREDO, F.A.; VIGO, G. I.; GIACOBONI, G. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 42, p. 59-52, 2010.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G.STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, v.30, p, 3123-3124, 2014.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*; v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PHILLIPS, I. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effect in relation to human health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 101-107, 2007.

PRETOSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PRICE, L.B.; GRAHAM, J.P.; LACKEY, L.G.; ROESS, A.; VAILES, R.; SILBERGELD, E. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environ Health Perspect.*, v. 115, n. 12, p. 1738-42, 2007.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER T.; YARZA P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res*, v. 41, 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Iowa: Wiley-blackwell, 1231 p., 2011.

RASHID, M. U.; WEINTRAUB, A.; NORD, C. E. Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Anaerobe*, v. 18, p. 249–253, 2012.

REDGRAVE, L.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M.; PIDDOCK, L. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *CellPress*, v. 22, n. 8, 2014.

ROSENGREN, L.; WALDNER, C.; REID-SMITH, R. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 5, p. 1373-1380, 2009.

SÁENZ, Y.; BRIÑAS, L.; DOMÍNGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 3996–4001, 2004.

SAMANTA, I.; JOARDAR, S.; MAHANTI, A.; BANDYOPADHYAY, S.; SAR, T.; DUTTA, T. Approaches to characterize extended spectrum beta-lactamase/ beta-lactamase producing *Escherichia coli* in healthy organized vis-a-vis backyard farmed pigs in India. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 36, p. 224-230, 2015.

SANDVANG, D.; DIGGLE, M.; PLATT, D. J. Translocation of integron-associated resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by Inc P and Inc W plasmids from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Microbial Drug Resistance*, v. 8, p. 151-160, 2002.

SCHINK, A.; KADLEC, K.; KASPAR, H.; MANKERTZ, J.; SCHWARZ, S. Analysis of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 1741-1749, 2013.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.; RYABIN, T.; HALL, J.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.; LESNIEWSKI, R. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, p.7537–7541. 2009.

SCHMIDT, B.; MULDER, I. E.; MUSK, C. C.; AMINOV, R. I.; LEWIS, M.; STOKES, C. R.; BAILEY, M.; PROSSER, J. I.; GILL, B. P.; PLUSKE, J. R.; KELLY, D. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28284, 2011.

SCHMITHAUSEN, R. M.; KELLNER, S.R.; SCHULZE-GEISTHOEVEL, S.V.; HACK, S.; ENGELHART, S.; BODENSTEIN, I.; AL-SABTI, N.; REIF, M.; FIMMERS, R.; KÖRBER-IRRGANG, B.; HARLIZIUS, J.; HOERAUF, A.; EXNER, M.; BIERBAUM, G.; PETERSEN, B.; BEKEREDJIAN-DING, I. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of *Enterobacteriaceae* expressing extended-spectrum beta-lactamases on a model pig farm. *Appl Environ Microbiol.*, v. 81, n. 21, p. 7633-7643, 2015.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. *Biotemas*, v. 22, n. 3, p. 11-17, 2009.

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

SCHWARZ, S.; CLOECKAERT, A.; ROBERTS, M.C. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: F.M. AARESTRUP (Ed.): *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washington D.C.: ASM Press, p. 73-98, 2006.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORDS, N.; VAN DUIJKERRENE, E.; JOHSON, A.P.; GAASTRAS, W. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 601-604, 2010.

SENGELØV, G.; AGERSØ, Y.; HALLING-SØRENSEN, B.; BALODA, S.B.; ANDERSEN, J.S.; JENSEN, L. B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.*, v. 28, n. 7, p. 587-95, 2003.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 762-765, 2008.

SKURNIK, D.; RUIMY, R.; READY, D.; RUPPE, E.; BERNÈDE-BAUDUIN, C.; DJOSSOU, F.; GUILLEMOT, D.; PIER, G.B.; ANDREMONT, A. Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 804-807, 2010.

SMETS, B. F.; BARKAY, T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 675-678, 2005.

SMITH, T.; GEBREYES, W.; ABLEY, M.; HARPER, A.; FORSHEY, B.; MALE, M.; MARTIN, H.; MOLLA, B.; SCREEVATSAN, S.; THAKUR, S.; THIRUVENGADA, M.; DAVIES, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers on Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. *PLOS One*, v. 8, n. 5, 2013.

SOMMER, M. O.; DANTAS, G.; CHURCH, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, v. 325, p. 1128-1131, 2009.

SOTO S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, v. 4, p. 223-229, 2013.

STARR, M. P.; REYNOLDS, D. M. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Am. J. Public Health Nations Health* v. 41, p. 1375-1380, 1951.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 664-689, 2009.

SUNDE, M.; NORSTROM, M. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J. Antimicrob Chemother*, v. 56, n. 1, p.89-90, 2005.

- TADESSE, D.; ZHAO, S.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M.; McDERMOTT, P. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 5, p. 741- 749, 2012.
- TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICHELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, v. 34, p. S3-10; S4-73, 2006.
- THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*; v. 67, n. 3, p. 419-431, 2010.
- THOMSON, J. R.; FRIENDSHIP, R. M. Difestive system. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. *Diseases of Swine*. Ames, IA: Wiley-Blackwell, p. 199-226, 2012.
- THORSTEINSDOTTIR, T.R.; HARALDSSON, G.; FRIDRIKSDOTTIR, V. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobialresistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. *Zoonoses Public Hlth*, v. 57, p. 189-19, 2010.
- TROBOS, M.; LESTER, C.; OLSEN, J.; FRIMODT-MOLLER, N.; HAMMERUM, A. Natural transfer os sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 80-86. 2008.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals – prejudices, perceptions and realities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 26-27, 2004.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; BRUISMA, N.; STOBBERINGH, E. E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 146–48, 2000.
- VAN HOEK, A. H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*; v. 2, n. 203, 2011.
- VIERA S. *Bioestatística Tópicos Avançados*. 3 ed., 278p, 2010.
- WASSENAAR, T. M.; SILLEY, P. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria: lessons learned from host-specific pathogens. *Animal Health Research Reviews*, v. 9, p. 177-186, 2008.
- WU, S.; DALSGAARD, A.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; JENSEN, L. B. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 52, p. 30-47, 2010.
- WU, S.; DALSGAARD, A.; VIEIRA, A. R.; EMBORG, H. D.; JENSEN, L. B. Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals,

carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, n. 3, p. 254-259, 2009.

YOU, Y.; SILBERGELD, E. K. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p.76-86, 2014

ZAURA, E.; KEIJSER, B.; HUSE, S.; CRIELAARD, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, v. 9, 2009.

ZHANG, A. Y.; WANG, H. N.; ZHOU, W. R. Detection and sequence analysis of antibiotic resistance genes in strains isolated from wild animals. *Anim. Husb. Vet. Med*, v. 3, p.1–3, 2007.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamase in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*; v. 39, n. 1, p. 79-101, 2013.

ZHU, Y.G.; JOHNSON, T.A.; SU, J.Q.; QIAO, M.; GUO, G.X.; STEDTFELD, R.D.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J. M. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 110, n. 9, p. 3435-3440, 2013.

ZOETENDAL, E. G.; CHENG, B.; KOIKE, S.; MACKIE, R. I. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Current Issues Intestinal Microbiology*, v. 5, p. 31-47, 2004.