

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Silvia Adriana Mayer Lentz

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *E. coli*
PROVENIENTES DE SUÍNOS, AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PERFIS CLONAIIS
CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO
AMBIENTE E NA CARNE *IN NATURA***

Porto Alegre

2022

Silvia Adriana Mayer Lentz

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *E. coli*
PROVENIENTES DE SUÍNOS, AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PERFIS CLONAIIS
CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO
AMBIENTE E NA CARNE *IN NATURA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Andreza Francisco Martins

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Lentz, Sílvia Adriana Mayer
CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS
DE E. coli PROVENIENTES DE SUÍNOS, AVALIAÇÃO DOS
DIFERENTES PERFIS CLONAIIS CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO
COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE E NA CARNE IN
NATURA / Sílvia Adriana Mayer Lentz. -- 2022.
188 f.
Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Colistina. 2. Resistência bacteriana. 3. mcr-1.
4. Suínos. 5. One Health. I. Martins, Andreza
Francisco, orient. II. Título.

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

“A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao amor da minha vida, Evandro da Silva Costa, pelo apoio, paciência e dedicação incondicionais nesta trajetória. Desde o momento que soubemos que nosso amor maior estaria por vir, envolveu-se no cuidado e dedicou-se a tentar suprir as ausências junto ao nosso filho Arthur Mayer Costa, que hoje está com três anos.

Gostaria de agradecer aos meus sogros por serem rede de apoio. Sem vocês, em meio à pandemia, não teria como continuar a desenvolver este projeto e concluir esta etapa. À minha mãe, por sempre ser pilar e porto seguro para todos os momentos de insegurança.

À minha orientadora, pela oportunidade de desenvolver um projeto de tamanha magnitude e responsabilidade, por ter me conduzido e aberto as oportunidades desde o mestrado.

À médica veterinária Paula Marques Rivas, pela amizade e parceria na realização deste trabalho, que me acompanhou em todas as viagens e coletas, e que me acompanha desde o mestrado. Sua participação foi de suma importância para o desenvolvimento desta pesquisa, em especial durante a minha gestação, que aconteceu em meio às coletas do doutorado.

Às colegas mestrandas Gabriela Simões de Oliveira e Rafaela Ramalho Guerra e às bolsistas de iniciação científica Franciele Caroline Adam, Thaianne Marques e Camila Zanfelice Müller, por terem feito parte deste projeto e contribuído para a realização desta pesquisa.

Às amigas Nayara Poletto Pires Botini, Juciana Clarice Cazarolli, Tanise Vendruscolo Dalmolin e Amanda Domingues, agradeço toda ajuda, amizade e apoio durante esta caminhada.

Às técnicas do LANAGRO Luise Jank, Renata Batista Rau e Tamara dos Santos Castilhos, pelas contribuições e apoio ao desenvolvimento desta tese.

À UFRGS, que me proporcionou suporte em todas as etapas.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento desta pesquisa, meu muito obrigada!

CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *E. coli* PROVENIENTES DE SUÍNOS, AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PERFIS CLONAIIS CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE E NA CARNE *IN NATURA*¹

Autor: Silvia Adriana Mayer Lentz
Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Andreza Francisco Martins

O Brasil ocupa um papel importante na produção de suínos, sendo o quarto maior produtor e exportador do mundo. Entretanto, a intensa administração de antimicrobianos na produção animal vem sendo relacionada à emergência da resistência bacteriana. A exposição à colistina leva à seleção de bactérias resistentes no ambiente. Neste contexto, o surgimento da resistência à polimixina, através do *mcr-1* tem causado preocupação. *Escherichia coli* tem sido considerada um bom indicador de resistência, uma vez que está presente no intestino dos animais. Nesse sentido, este estudo teve como objetivos: investigar a ocorrência dos principais genes de resistência de importância clínica (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *mcr-1*) em isolados de *E. coli* obtidos da cadeia suinocultora; avaliar a ocorrência de resíduos de antimicrobianos relacionados a estes genes; e correlacionar com os resíduos de antimicrobianos encontrados na carne e ambiente. O sequenciamento do genoma completo (WGS) foi realizado em alguns isolados a fim de caracterizar ambiente genético envolvido no mecanismo de resistência encontrado. Um total de 442 isolados de *E. coli* (268 suínos e 174 ambientais) foram avaliados. A prevalência do gene *mcr-1* foi de 25% (109/442) e foi encontrado em 67 isolados de animais e 42 do meio ambiente. Destes, um total de 35/67 (52%) de suínos e 28% (12/42) de isolados ambientais foram considerados resistentes à colistina (CIM ≥ 4mg/L). Mais de 96% (105/109) foram resistentes à enrofloxacina, 70% (77/109) resistentes a pelo menos uma cefalosporina testada e 86% (90/109) foram considerados multirresistentes. Tilosina foi o antibiótico mais administrado através da ração, sendo detectado em 50% dos lotes (23/46); na água, norfloxacino apareceu em 19,6% (9/46); e, no músculo, foram encontrados resíduos dos antibióticos: norfloxacino, doxiciclina e oxitetraciclina em 15% (7/46) dos lotes avaliados. A alta prevalência de *mcr-1* associada à ocorrência de outros determinantes de resistência é uma preocupação atual. Os animais e o meio ambiente foram diretamente impactados por essa prática, mas o efeito da exposição antimicrobiana sobre os níveis de genes de resistência aos antimicrobianos é muito complexo. Assim, o monitoramento do uso de medicamentos tornou-se importante para garantir a segurança alimentar. Alternativas ao uso de antimicrobianos na produção animal devem ser implementadas com urgência.

Palavras-chave: Colistina. Resistência bacteriana. *mcr-1*. Suínos. *One Health*.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (192 p.) março, 2022.

CHARACTERIZATION OF RESISTANCE GENES OF *E. coli* ISOLATES FROM SWINE, EVALUATION OF DIFFERENT CIRCULATING CLONAL PROFILES AND THEIR RELATIONSHIP WITH ANTIBIOTIC WASTE IN THE ENVIRONMENT AND IN FRESH MEAT²

Author: Silvia Adriana Mayer Lentz

Advisor: Prof^a. Dr^a. Andreza Francisco Martins

Brazil plays an important role in swine production, being the 4th largest producer and exporter in the world. However, the intense use of antimicrobials in animal production has been related to the emergence of bacterial resistance. The exposure to antibiotics such as Colistin leads to a selection of resistant bacteria in the environment. In this context, the emergence of polymyxin resistance, mediated by gene *mcr-1*, has caused great concern. *Escherichia coli* has been considered a good indicator of resistance, since it is present in the gut of animals. This study aimed to investigate the occurrence of the main resistance genes of clinical importance (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *mcr-1*) in *E. coli* isolates obtained from swine production chain; to evaluate the occurrence of antimicrobial residues related to these genes; and to correlate with the antimicrobial residues found in the meat and environment. Whole genome sequencing (WGS) was performed in some isolates in order to characterize the genetic environment involved in the resistance mechanism found. A total of 442 *E. coli* isolates (268 swine and 174 environmental) were analyzed. The prevalence of the *mcr-1* gene was 25% (109/442) and was found in 67 isolates from animals and 42 from the environment. Of these, a total of 35/67 (52%) of swine and 28% (12/42) of environmental isolates were considered resistant to colistin (MIC ≥ 4mg/L). More than 96% (105/109) were resistant to enrofloxacin, 70% (77/109) were resistant to at least one cephalosporin tested, and 86% (90/109) were considered multidrug. Seventy percent (76/109) of the *mcr-1* positive isolates were co-producers of at least one of the cephalosporin (*bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}) or quinolone (*qnr*) resistance genes. Tylosin was the most administered antibiotic through the feed, being detected in 50% of the lots (23/46); in water norfloxacin appeared in 19.6% (9/46), and in muscle residues of antibiotics were found: norfloxacin, doxycycline and oxytetracycline in 15% (7/46) of the evaluated lots. The high prevalence of *mcr-1* associated with the occurrence of other resistance determinants is a current concern. Animals and the environment have been directly impacted by this practice, but the effect of antimicrobial exposure on antimicrobial resistance gene levels is very complex. Thus, monitoring the use of antimicrobials has become important to ensure food safety. Alternatives to the use of antimicrobials in animal production must be implemented urgently.

Keywords: Colistin. Bacterial resistance. *mcr-1*. Pigs. One Health.

² Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (192 p.) March, 2022.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO BRASIL	20
3.2 UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM MEDICINA VETERINÁRIA	21
3.2.1 Uso de Antimicrobianos na Suinocultura.....	25
3.3 RESERVATÓRIOS AMBIENTAIS DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	27
3.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	29
3.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>E. coli</i>	30
3.5.1 Mecanismos de Resistência em <i>E. coli</i>	33
3.5.1.1 Resistência aos β -lactâmicos em <i>E. coli</i>	35
3.5.1.2 Resistência a quinolonas.....	41
3.5.1.3 Resistência às polimixinas mediada por plasmídeo	43
3.5.1.4 Elementos genéticos associados ao gene <i>mcr</i>	47
3.6 TIPAGEM MOLECULAR.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 DESENHO DO ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS	53
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	56
4.2.1 Amostras de suínos.....	56
4.2.2 Coleta de amostras ambientais	56
4.2.2.1 <i>Swab</i> bebedouro	56
4.2.2.2 <i>Swab</i> arraste da pocilga	56
4.2.2.3 Esterqueiras	57
4.2.2.4 Água.....	57
4.3 IDENTIFICAÇÃO <i>E. coli</i>	58
4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	59

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima para polimixinas, quinolonas e cefalosporinas	59
4.5 PESQUISA FENOTÍPICA DE ESBL ATRAVÉS DO TESTE DE SINERGISMO DE DISCO DUPLO (TSDD).....	60
4.6 PESQUISA FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES ATRAVÉS DO TESTE DE BLUECARBA.....	60
4.7 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	60
4.7.1 Extração de DNA.....	60
4.7.2 Pesquisa genotípica de ESBLs	61
4.7.3 Pesquisa de genes de resistência a quinolonas (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>).....	61
4.7.4 Pesquisa de genes de Carbapenemases pela Técnica de PCR Multiplex em Tempo Real (<i>Multiplex High Resolution Melting (HRM) Real Time PCR</i>)	64
4.7.5 Pesquisa genotípica para detecção do gene <i>mcr-1</i>	64
4.8 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO	64
4.9 ANÁLISE DE ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO LC-MS/MS	65
4.10 COLETA DE DADOS	67
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
6 ASPECTOS ÉTICOS	69
7 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	70
7.1 ARTIGO 1: <i>MCR-1</i> GENE IN LATIN AMERICA: HOW IS IT DISSEMINATED AMONG HUMANS, ANIMALS, AND THE ENVIRONMENT?.....	70
7.2 ARTIGO 2: HIGH GENOMIC SIMILARITY AMONG INCX4 PLASMIDS CARRYING <i>MCR-1.1</i> GENE FROM HUMANS, ANIMALS, AND THE ENVIRONMENT IN SOUTHERN BRAZIL	71
7.3 ARTIGO 3: ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE AND DISSEMINATION OF COMMENSAL <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN PIG FARMS AND THE ASSOCIATION WITH ANTIMICROBIAL RESIDUES IN THE PORK	84
8 DISCUSSÃO GERAL	122
9 CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS TESE	130
ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO PROJETO DOUTORADO.....	180
ANEXO 2 – E-MAIL CONTENDO A APROVAÇÃO DO PROJETO CEUA – UFRGS	181

ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	182
ANEXO 4 – CARTA DE APROVAÇÃO PROJETO HCPA	188

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais β -lactamases encontradas em animais.	37
Tabela 2. Primeiros relatos das variantes do gene <i>mcr</i> distribuídas no mundo.	46
Tabela 3. Primers e condições de PCR utilizadas para a pesquisa dos genes: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{IMP-type} , <i>bla</i> _{VIM-type} , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{KPC-type} , <i>bla</i> _{GES -type} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>fumC</i> , <i>fimH</i> e <i>mcr-1</i>	62
Tabela 4. Antimicrobianos avaliados por LC/MS-MS.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de realização das coletas contendo a distribuição das granjas no Estado do Rio Grande do Sul.....	53
Figura 2. Representação esquemática do estudo realizado.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCS	Associação Brasileira de Produtores de Suínos
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente-invasiva
AMC	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
AMR	<i>Antimicrobial resistance</i>
ARG	Genes de resistência aos antimicrobianos
ATM	Antimicrobianos
BGN	Bacilo Gram-negativo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST	<i>Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EFT	Ceftiofur
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENR	Enrofloxacino
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamases</i>
ESI	Sonda de eletropulverização
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América

EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal patogênica
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Cefepima
GM	Gentamicina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
Inc	Incompatibilidade plasmidial
InPEC	<i>Escherichia coli</i> intestinal patogênica
ITU	Infecções de trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography –Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCR	<i>Mobile colistin resistance</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NBM	Meningite neonatal
NDM	New Delhi metallo-beta lactamase
MDR	<i>Multi-drug resistant</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite neonatal
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilina
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PMQR	<i>Plasmid-mediated quinolone resistance</i>
SC	Santa Catarina
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de sepse

SHU	Síndrome hemolítica e urêmica
SI	Sequência de Inserção
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina <i>Shiga</i>
STX	Sulfametoxazol com Trimetoprim
TET	Tetraciclina
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TSDD	Teste de Sinergismo de Duplo Disco
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VIM	<i>Verona Integron-Mediated Metallo-β-Lactamase</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro

1 INTRODUÇÃO

Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a resistência aos antimicrobianos como uma das três principais ameaças à saúde pública do século 21 (WHO, 2012). A emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos limita as opções de tratamento não somente em humanos, como também em animais, representando uma ameaça aos antibióticos já utilizados na prática clínica. (O'Neill, 2014; Garg et al., 2017; WHO, 2022).

Na produção animal, os antimicrobianos são amplamente utilizados como aditivos melhoradores de desempenho desde 1950, quando o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a sua utilização. Entretanto, o uso de antimicrobianos com esta finalidade tem sido um fator importante na emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos. (Au et al., 2021).

A suinocultura mundial está em frequente expansão. Nesse cenário, o Brasil atua como protagonista, contribuindo com recordes de produção e ganhando destaque nas exportações mundiais, passando de 7,4% dos volumes, em 2018, para 10,4%, em 2021 (USDA, 2021). Contudo, os suínos têm sido apontados como um potencial reservatório de resistência aos antimicrobianos (AMR).

Nas últimas décadas, o rápido aumento de bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, resultou na reintrodução das polimixinas no arsenal terapêutico. Em particular, a colistina (polimixina E) está sendo usada como antibiótico de último recurso para o tratamento de infecções graves causadas por estes patógenos. (Munoz-Price et al., 2013; Poirel et al., 2017).

Nesse contexto, o surgimento da resistência à polimixina, mediada por um gene plasmídico transferível *mcr-1*, vem causando preocupação (Liu et al., 2016a). A *Escherichia coli* tem sido considerada como o principal reservatório do gene *mcr-1*, além de ser vista como um bom indicador de resistência, uma vez que está presente no intestino dos humanos e animais, além de estar amplamente distribuída no ambiente. (Rochelle-Newall et al., 2015; Nordmann et al., 2016; Braz et al., 2020).

A partir disso, torna-se necessária uma intensificação da vigilância sobre o uso de antimicrobianos e a ocorrência de bactérias carreadoras destes genes na cadeia alimentar e de outras fontes de origem animal, a fim de conhecer melhor o

potencial reservatório ambiental destes genes e contribuir para a formulação de medidas que busquem reduzir a sua propagação potencial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência e disseminação de genes de resistência em isolados de *Escherichia coli* no ambiente da suinocultura e detectar resíduos de antimicrobianos no ambiente e na carne *in natura*.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* obtidos de suínos;
- 2.2.2 Determinar a ocorrência dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *mcr-1* em isolados de *E. coli*;
- 2.2.3 Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de *E. coli* portadores do gene *mcr-1*;
- 2.2.4 Avaliar a relação entre as *Sequence Types* (STs) de *E. coli mcr-1* positivos obtidos dos animais e do ambiente;
- 2.2.5 Analisar a exposição dos animais aos antimicrobianos através das fichas de acompanhamento dos animais e boletins sanitários;
- 2.2.6 Avaliar a exposição dos animais aos antimicrobianos através da detecção de resíduos na água, ração e carne;
- 2.2.7 Relacionar a exposição dos animais aos antimicrobianos com o perfil fenotípico e genotípico de resistência dos isolados de *E. coli*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO BRASIL

A carne suína é a mais consumida no mundo (USDA, 2021). A demanda por esta carne tem aumentado nas últimas décadas como resultado de mudanças nos padrões de consumo à medida que a renda aumenta, principalmente nos países em desenvolvimento. Somado à avicultura, o setor de suínos é o subsetor de pecuária que mais cresce: o número de animais, hoje, é de mais de 1 bilhão de matrizes, o dobro dos anos 1970. (USDA, 2021).

No cenário mundial, China, União Europeia, Estados Unidos e Brasil lideram o mercado mundial de carne suína, produzindo 81% (79.277 milhões de toneladas) do total (USDA, 2021, disponível em <https://apps.fas.usda.gov/psdonline>). A China é o maior produtor mundial e consome cerca de 500 milhões de suínos por ano, quase metade do total produzido mundialmente. (Yuan et al., 2021; Pharmaceuticals, 2015).

A cadeia produtiva brasileira ocupou o quarto lugar em produção e exportação no ano de 2020, segundo dados da Embrapa Suínos e Aves (Miele et al., 2021), tendo produzido 4.436 milhões de toneladas de carne suína, das quais, 77% foram destinadas ao consumo interno e 23% ao mercado exportador. No total, 1.024 milhões de toneladas foram exportadas, gerando uma receita de 2.269 milhões de dólares para nosso país. (ABPA, 2021).

Com relação ao consumo brasileiro de carne, o país ocupa o quinto lugar no mercado mundial, tendo um consumo *per capita* que variou entre 15 e 16 kg, em 2020 (ABPA, 2021). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam crescimento no consumo de carne suína no Brasil, sendo que, atualmente, esse consumo chega a 17,58 kg, um marco histórico no país. (IBGE, 2021).

Nas exportações de suínos, os estados da região Sul ganham destaque, são responsáveis por mais de 91% das exportações brasileiras, ficando o Rio Grande do Sul (RS) em segundo lugar (25,79%), apenas atrás de Santa Catarina (SC). (ABPA, 2021).

De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Suínos (ABCS), o perfil da cadeia produtiva brasileira varia de acordo com a região. A região sul do

país é caracterizada por um sistema intensivo de produção integrado, tendo como principais objetivos a alta produção animal com baixo custo, que visa alcançar uma alta performance produtiva e zootécnica (ABCS, 2016; 2022). Cerca de 60% das granjas de terminação desta região têm até 500 animais alojados, sendo que aproximadamente 81% dessas fazendas estão engajadas em sistema integrado ou cooperativo. (ABCS, 2018).

O sistema integrado possui operações que são coordenadas verticalmente, através de uma agroindústria que apresenta como atributos o fornecimento de ração, genética, logística e assistência técnica. (EMBRAPA, 2022).

Todavia, algumas das características do sistema intensivo como a alta densidade animal (número de animais por m² de piso das instalações), a mistura de leitões de diferentes origens, o desmame de leitões muito jovens e a presença de outros fatores de risco ambientais, são motivos estressantes aos animais e resultam quase que diretamente em problemas sanitários e na ocorrência de doenças respiratórias e entéricas. (Salak-Johnson et al., 2007; Street et al., 2008; Burow et al., 2014).

Dessa forma, a fim de viabilizar uma suinocultura eficiente e lucrativa os animais são submetidos a mecanismos de defesa adicionais, dos quais o uso coletivo de antimicrobianos (ATM) e as vacinas acabam funcionando como ferramentas preventivas e de controle de doenças.

3.2 UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM MEDICINA VETERINÁRIA

A utilização de antimicrobianos na cadeia produtiva animal tem sido empregada de duas principais formas. O uso terapêutico ou “uso médico veterinário” engloba a utilização dos antimicrobianos na metafilaxia, profilaxia ou tratamento dos animais (FAO; WHO, 2021). E, a utilização de antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho, que são classificados como uso não terapêutico de acordo com as definições do Código de Práticas do *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2021).

O uso de ATM como melhoradores de desempenho é feito através da administração de subdoses de aditivos antibacterianos, especialmente junto à ração

(Teillant et al., 2015); e tem como finalidade aumentar as taxas de crescimento animal e eficiência alimentar enquanto reduzem a mortalidade. (Teillant et al., 2015).

O mecanismo de ação dos aditivos melhoradores de desempenho não está completamente esclarecido. De um modo geral, ocorre a redução da carga bacteriana total e o aumento da absorção de nutrientes, isso determina um acréscimo diário de ganho de peso e, conseqüentemente, uma melhor conversão alimentar. Favorece o crescimento de alguns microrganismos e previne uma possível multiplicação bacteriana patogênica no trato gastrointestinal (Durso et al., 2014). Acredita-se que a eficiência alimentar aconteça em razão da redução da carga bacteriana entérica e, em vista disso, haja diminuição da energia consumida; sendo, então, a energia disponível utilizada no crescimento animal. (Hardy, 2002).

Contudo, essa utilização de antimicrobianos pode provocar efeitos negativos, como o aumento da ocorrência de algumas doenças. A administração de antimicrobianos elimina algumas bactérias comensais da microbiota intestinal e aumenta a chance de cepas patogênicas e resistentes aos antimicrobianos colonizarem o intestino destes animais. (Hill et al., 2010).

Outra forma de uso dos ATM discutida é a profilaxia. De acordo com as definições do *Codex* a profilaxia acontece através da administração ou aplicação de agentes antimicrobianos a um indivíduo ou grupo de animais em risco de adquirir uma infecção específica ou em uma situação específica em que é provável que ocorra doença infecciosa se o agente antimicrobiano não for administrado ou aplicado (FAO, WHO, 2021) Nesta terapia, os ATMs são administrados por um período curto, em doses terapêuticas para doenças que já se sabe que têm alta probabilidade de ocorrer em determinada faixa etária, como maneira de prevenir a ocorrência dos sinais clínicos. No entanto, a ração suplementada é usada por alguns dias, e não regularmente. Os ATMs são empregados nas etapas de maior estresse para os animais, como troca de alojamento, contato com animais de origens diferentes e período pós-desmame, quando algumas doenças podem se manifestar (Barton, 2014). Um exemplo típico de ocorrência de doença pós-desmame é a infecção por *E. coli*, que costuma acontecer entre cinco e 20 dias após essa prática em suínos (Barcellos et al., 2009).

Além desses dois delineamentos de utilização de antimicrobianos, há a metafilaxia, que é definida como a administração ou aplicação de agentes

antimicrobianos a um grupo de plantas/culturas ou animais contendo indivíduos doentes e saudáveis (supostamente infectados), que é utilizada para tratar os animais doentes e todos os seus contatos (animais da mesma baía) (Barcellos et al., 2009; Barton, 2014; FAO, WHO, 2021). Essa administração ocorre quando identificados os primeiros sinais clínicos e através da adição do antibiótico à ração animal. Não se pode esquecer também a utilização terapêutica ou curativa, em que o tratamento das doenças acontece através da administração ou aplicação de agentes antimicrobianos a um indivíduo ou grupo de animais que apresentem sinais clínicos de doença infecciosa. Sua utilização visa à recuperação da saúde, evitando dor e sofrimento dos animais e, sobretudo, possui o objetivo de promover o bem-estar animal.

A administração oral é, de longe, a via de administração mais comum de antimicrobianos em suínos, seja ela realizada por meio da ração ou água, correspondendo a 90% do total de antimicrobianos utilizados. (Chauvin et al., 2002; Rajić et al., 2006; Callens et al., 2012; Merle et al., 2012; Burow et al., 2014; Postma et al., 2015; Van Rennings et al., 2015; Sarrazin et al., 2018; Burow et al., 2019).

Van Boeckel e colaboradores estimaram, em estudos anteriores, que 73% de todos os antimicrobianos vendidos globalmente são usados em animais de produção (Van Boeckel et al., 2017). O consumo médio global de antimicrobianos é de 172mg/kg, 148mg/kg e 45mg/kg para suínos, frangos e bovinos, respectivamente (por Kg de animal produzido). Numa análise realizada pela *World Organization for Animal Health* (Organização Mundial de Saúde Animal) – OIE – que reúne informações de 93 países referente ao ano de 2016, o consumo global total de antimicrobianos em animais foi de 92.269 toneladas, em 2016, distribuídos numa média de 144,39 mg/kg (OIE, 2020). A tetraciclina foi o antimicrobiano mais utilizado (35,3%), seguida por penicilinas (16,4%), macrolídeos (10,9%) e polipeptídeos (10,5%) (Van Boeckel et al., 2015; OIE, 2020).

O relatório anual da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) apresentou informações importantes sobre o emprego de antimicrobianos em animais em 2018. O relatório contou com a participação de 153 países, dos quais, 23% relataram a utilização de antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho. Quando diferenciados por região da OIE, as Américas e Ásia, Extremo Oriente e Oceania têm as maiores proporções de países que usam antimicrobianos com esta finalidade. (OIE, 2020).

Desde 1997, a União Europeia vem sinalizando a proibição total dos antibióticos como aditivos alimentares. Iniciou com a avoparcina, em 1997, e baniu totalmente a utilização de aditivos, em 2006 (UE, 2003). A tilosina foi banida em 1999; e a bacitracina, que ainda é utilizada no Brasil, foi proibida há mais de 20 anos (Xiong et al., 2018). A Europa tem trabalhado nesta questão há muitos anos e isso se reflete nas respostas fornecidas, sendo uma das regiões com menor percentual de uso e autorização de aditivos melhoradores de desempenho.

Um dos antimicrobianos mais utilizados na produção animal é a colistina. O consumo dela em animais aumentou. Em meados do século XX foi particularmente alto em países de renda baixa e média. Sua utilização expandiu-se em 13% no Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul entre os anos de 2000 e 2010 (Laxminarayan et al., 2016). A China não só ganha destaque enquanto maior produtor mundial de carne suína, bem como é o maior consumidor mundial de antimicrobianos (Pharmaceuticals, 2015; Yuan et al., 2021).

O uso anual de colistina, na China, variou de 2.470 a 2.875 toneladas métricas de 2011 a 2015, o que tornou a China o maior usuário de polimixinas no mundo (Shen et al., 2016). Na União Europeia, embora a colistina esteja disponível para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas em animais, sua utilização foi banida como melhorador de desempenho, em 2006. (Maron et al., 2013).

Entretanto dados da rede de Vigilância Veterinária Europeia de Consumo de Antimicrobianos mostram que o consumo entre os países europeus ainda persiste para outras finalidades e varia entre os países. As polimixinas foram a quinta classe de antimicrobianos mais amplamente consumida durante os anos de 2013 a 2015, porém, nenhuma polimixina foi vendida na Finlândia, Islândia e Noruega. Em vários países desenvolvidos, como Canadá e Estados Unidos, a colistina nunca foi aprovada para uso em animais. (EMA/AMEG, 2016, ECDC/EFSA/EMA, 2017).

No Brasil, até 2016, a colistina ainda podia ser utilizada como aditivo melhorador de desempenho na produção animal. Entretanto, a partir de 22 de novembro de 2016, com a Instrução Normativa (IN) 45/2016 (Brasil, 2016), ela passou a integrar a lista de aditivos proibidos dada sua importância à saúde humana e, em especial, ao contexto da disseminação plasmidial do gene *mcr-1* notificado no Brasil. Apesar da IN ter sido publicada em 2016, a restrição passou a vigorar a contar de novembro de 2018, no país.

O movimento de retirada da colistina em outros países, igualmente, passou a acontecer. Além da proibição brasileira que ocorreu em novembro de 2016, países como Tailândia (fevereiro de 2017), China (abril de 2017), Japão (julho de 2018), Malásia (janeiro de 2019), Argentina (fevereiro de 2019) e Índia (julho de 2019) também proibiram o uso da colistina como aditivo alimentar em animais de produção. (FAO, 2016).

Em janeiro de 2020, uma nova IN (01-2020) proibiu a importação, fabricação, comercialização e uso de aditivos melhoradores de desempenho contendo os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana (Brasil, 2020). Apesar de serem usados mais amplamente na medicina veterinária (tilosina e tiamulina), pertencem às classes antimicrobianas: macrolídeos, lincosamidas e pleuromutilinas, bastante utilizadas na clínica médica humana. Portanto, o objetivo é evitar que sua utilização possa selecionar cepas resistentes que venham a ser transmitidas ao homem.

Estes estudos confirmam que os antibióticos de importância veterinária, definidos como antimicrobianos criticamente importantes de maior prioridade em humanos na lista da OMS (WHO, 2017), ainda são comumente usados na produção de suínos.

3.2.1 Uso de Antimicrobianos na Suinocultura

Antimicrobianos são ferramentas eficazes para prevenir e tratar doenças e tiveram efeitos profundos na morbidade, mortalidade e combate às infecções bacterianas. Na suinocultura, entre as bactérias mais prevalentes associadas a doenças suínas estão: *Escherichia coli* (causando diarreia, doença do edema e septicemia), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (causando pleuropneumonia suína), *Staphylococcus hyicus* (causando epidermite exudativa), *Bordetella bronchiseptica* (envolvida na rinite atrófica e broncopneumonia) e *Streptococcus suis* (causando, por exemplo, meningite, artrite, pneumonia e septicemia). (Gutiérrez-Martín et al., 2006; Zhao et al., 2011; Zimmerman et al., 2012; Varela et al., 2013).

Uma revisão sistemática, envolvendo dados de países como União Europeia e América do Norte, apontou que as classes de antimicrobianos mais utilizadas na criação de suínos são – penicilinas, tetraciclina e macrolídeos (Cuong

et al., 2018). As penicilinas têm ações bactericidas contra patógenos Gram-negativos e Gram-positivos (Lobanovska et al., 2017). São frequentemente aplicados para profilaxia e tratamento de septicemia, infecções respiratórias e do trato urinário em uma ampla gama de espécies animais. As tetraciclinas são largamente aproveitadas para o tratamento de doenças respiratórias causadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*; mas, a resistência às tetraciclinas é comum. Por exemplo, 22% de *Pasteurella multocida*, 15% de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 82% de *Streptococcus suis* foram relatados como resistentes às tetraciclinas. (de Jong et al., 2014).

Dados do FDA, Estados Unidos, incluídos no relatório de 2020, indicam que entre o total de antimicrobianos utilizados nos animais produtores de alimentos, as espécies bovinas e os suínos dividem a maior participação, sendo que cada um deles usou 41% do total de antimicrobianos medicamente importantes aprovados para uso em animais produtores de alimentos (82% ao total). Tetraciclinas foram responsáveis por 66%, penicilinas – 13%, macrolídeos – 7%, sulfonamidas e aminoglicosídeos por 5% cada um, seguidos por lincosamidas (2%), cefalosporinas e fluoroquinolonas (menos de 1% cada) (FDA, 2021). Estima-se que 87% das lincosamidas e 42% dos macrolídeos foram destinados ao uso em suínos. (FDA, 2021).

Tiseo e colaboradores, num estudo publicado em 2020, realizaram uma projeção valendo-se de um modelo de regressão multivariada, estimando as vendas globais de antimicrobianos de 2017 em 93.309 toneladas. A China foi o maior consumidor de antimicrobianos veterinários em 2017, respondendo por 45% do uso global, e a projeção é que continue sendo o maior consumidor em 2030 (43%). (Tiseo et al., 2020).

Neste estudo, o Brasil esteve entre os dez maiores consumidores de antimicrobianos veterinários – ocupando o segundo lugar em consumo, com 7,9% - estando apenas atrás da China e à frente dos Estados Unidos (7,0%), que atingiu o terceiro lugar. Dados trazidos pela análise informam que, juntos, esses dez países respondem por 75% dos antimicrobianos empregados na produção animal (Tiseo et al., 2020). Ademais, prospectivamente, avaliaram que, entre 2017 e 2030, os suínos contribuirão com 45% para o aumento total do consumo entre os animais produtores de alimentos, sendo a categoria animal que apresentou o maior aumento.

No Brasil, todas as substâncias antimicrobianas utilizadas devem ser informadas no Boletim Sanitário dos Animais, documento oficial obrigatório que acompanha os lotes no momento do abate. Para que possam ser utilizadas, estas substâncias devem constar na lista de aditivos alimentares autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), consoante lista atualizada, de 25 de abril de 2015 (Brasil, 2020). Outrossim, os produtores devem respeitar o período de carência compreendido entre a administração do fármaco e o abate dos animais, evitando, desse modo, a presença de resíduos nos produtos de origem animal que serão consumidos (carne, mel, leite, e seus derivados).

A relação entre o uso de antimicrobianos e a emergência de bactérias resistentes já está bem estabelecida (Bell et al., 2014). Pesquisas demonstraram que os antimicrobianos aplicados na produção animal são os principais responsáveis pela disseminação de genes de resistência antimicrobiana (ARG) e, especificamente, para aqueles antimicrobianos administrados em níveis subterapêuticos. (Kanwar et al., 2014; Xiong et al., 2018).

O MAPA disponibiliza, no Brasil, uma lista com 22 produtos permitidos para utilização como melhoradores de desempenho (Brasil, 2015). Entre eles, atualmente, há compostos como virginamicina, salinomicina, monensina sódica, flavomicina, halquinol, espiramicina, enramicina, clorohidroxiquinolina, cloridrato de ractopamina, entre outros.

3.3 RESERVATÓRIOS AMBIENTAIS DE GENES DE RESISTÊNCIA

Estudos de genomas microbianos comensais, humanos e ambientais mostram que a resistência aos antibióticos é ubíqua e antiga, assinalando uma quantidade muito maior de genes de resistência aos antimicrobianos do que foi previamente reconhecido (D'Costa et al., 2011; Perry et al., 2016). Trabalhos revelaram a resistência em cavernas isoladas e em humanos preservados por centenas de anos. (D'Costa et al., 2011; Perry et al., 2016).

A AMR foi prevista antes do início da produção e utilização comercial de antimicrobianos. Os genes que codificam para AMR já existiam muito antes da sua descoberta e produção comercial (D'Costa et al., 2011; Van Hoek et al., 2011; Martínez, 2012; Wright et al., 2012; Li et al., 2015; Perry et al., 2016). Na maioria dos

casos, a descoberta dos genes de resistência e a sua expressão fenotípica ocorreram antes ou imediatamente após a utilização em massa de um determinado antimicrobiano. (Friedman et al., 2016).

Adicionalmente, encontraram-se genes de resistência aos antimicrobianos em regiões e locais com pouca ou nenhuma interação humana (Allen et al., 2009; Lang et al., 2010; Van Goethem et al., 2018). Exemplificando, Lee et al. (2019), citando trabalhos anteriores realizados com Park et al. (2018), identificaram genes de resistência aos antimicrobianos em sedimentos do fundo do mar, que têm dezenas de milhares de anos.

A origem de muitos genes de resistência em patógenos é oriunda de bactérias ambientais, incluindo organismos produtores de antibióticos, que existem há milhares de anos. Um importante mecanismo de resistência que impactou na saúde humana foi a resistência aos β -lactâmicos, cujas enzimas (β -lactamases) que inativam estes antimicrobianos existem há milhões de anos na natureza. (Aminov, 2009).

Apesar da resistência antibiótica ser reconhecidamente antiga, as comunidades bacterianas são impactadas diretamente por fatores ecológicos e ambientais. Dessa maneira, a utilização imprópria e excessiva de antimicrobianos na medicina humana e na produção de animais (Silbergeld et al., 2008; Holmes et al., 2016; O'Neill, 2016), pode selecionar populações resistentes no ambiente, e outros fatores, como condições físico-químicas, contaminantes ambientais, indução de respostas ao estresse, a adaptação bacteriana e a heterogeneidade fenotípica têm o potencial para aumentar o efeito de pressões seletivas e promover a evolução bacteriana no sentido de selecionar cepas mais resistentes. (Berendonk et al., 2015).

Ainda, a água e o saneamento deficientes podem permitir a propagação dos microrganismos, em países de média e baixa renda, contribuindo para os altos índices de resistência nestes locais. A subsequente transmissão é afetada por padrões de controle de infecção, saneamento, e difícil acesso à água potável (Finley et al., 2013). Frost e colaboradores evidenciaram, inclusive, que viajar a países com estas características é um fator de risco associado à aquisição e disseminação da resistência. (Frost et al., 2019).

A pecuária é um dos setores que possui potencial como reservatório de bactérias resistentes (Alonso et al., 2017a). O uso de antimicrobianos na produção animal está diretamente relacionado à detecção de microrganismos resistentes em

produtos de origem animal (Baron et al., 2014; Chantziaras et al., 2014). Sua utilização em escala tem o poder de acelerar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos resistentes, assim como os organismos comensais. (Chen et al., 2019).

3.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência antimicrobiana a uma vasta gama de agentes infecciosos é uma enorme ameaça para a saúde pública (Aslam et al., 2010; Laxminarayan et al., 2013; WHO, 2014; Ferri et al., 2017; Frieri et al., 2017), primordialmente, porque, nas últimas duas décadas, enfrenta-se uma pausa na descoberta e na emergência de fármacos eficazes para combater patógenos microbianos (Coates et al., 2011; Hollis et al., 2014; Kalkreuter et al., 2020). Nos últimos 50 anos, somente um antimicrobiano pertencente a uma nova classe, a daptomicina de espectro restrito, foi descoberto e usado em cenários clínicos. (Lewis, 2012; Piddock, 2012; Fernandes P et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a AMR desenvolve-se quando um microrganismo, como bactéria, fungo, vírus ou parasita, já não pode ser destruído, ou ter o seu crescimento limitado por um fármaco ao qual, anteriormente, era sensível. Isto leva a dificuldades no tratamento e controle de infecções, com internações prolongadas e risco aumentado de transmissão de doenças, elevação dos custos socioeconômicos e maiores riscos de morte (WHO, 2014). A AMR causa um a ampliação de 50% nos riscos de causar morte em comparação com doenças causadas por microrganismos não resistentes. (WHO, 2018).

Como definição, a resistência aos antimicrobianos – RAM ou AMR da sigla em inglês – é o resultado da capacidade dos microrganismos de sofrer mutações, adquirir elementos genéticos móveis que codificam genes de resistência e de transferir plasmídeos entre hospedeiros. As mutações podem levar à alteração do sítio de ligação de determinado antimicrobiano, hiper-regular a produção de enzimas, inativando o princípio ativo e, também, alterar a proteína de transporte da membrana externa. (Monroe et al., 2000; Alekshun et al., 2007).

As transferências horizontais de genes de resistência podem suceder no solo, na água, no trato gastrointestinal de humanos e animais, em alimentos, e outros ambientes, e verificam-se através de três mecanismos: transdução, conjugação e

transformação (Verraes et al., 2013). Geralmente, os genes de resistência localizam-se em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e cassetes gênicos em integrons, além de poder estar presentes em DNA livre e bacteriófagos. Estes genes podem ser transferidos entre bactérias de diferentes grupos taxonômicos e em diferentes nichos ecológicos. (Levy et al., 1989; Levy, 2002).

A replicação dos plasmídeos acontece independentemente dos cromossomos e estes elementos podem ser transferidos entre as bactérias por conjugação. Sua presença dentro da bactéria não é essencial, mas pode conferir uma vantagem adaptativa e desempenhar um papel essencial na sobrevivência deste microrganismo (Verraes et al., 2013). Embora existam vários genes que conferem resistência aos antimicrobianos, cada um com uma característica própria, eles podem se acumular no mesmo organismo, podendo conferir resistência a múltiplos antimicrobianos. (Levy et al., 2004; Davies et al., 2010).

3.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *E. coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria entérica tipicamente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais que está cada vez mais envolvida em infecções intestinais e extra-intestinais atuando também como patógeno oportunista. (Riley, 2020; Denamur et al., 2021). É uma das bactérias mais estudadas no mundo e pode estar amplamente disseminada no ambiente. Pode ser definida como um bacilo Gram-negativo, não esporulado, aeróbico, integrante da ordem *Enterobacterales*, capaz de se reproduzir em cerca de 20 minutos (Jang et al., 2017), e este rápido crescimento permite a observação da evolução de mais de 50.000 gerações, tornando-se um modelo de estudo (Tenailon et al., 2016). Seu genoma varia entre 4,2 a 6,0 Mbp, o que corresponde a 3.900-5.800 genes, respectivamente. (Oliphant et al., 2002; Gillespie, 2016; Oliveira et al., 2019).

A *E. coli* possui uma forte estrutura filogenética representada por, pelo menos, oito grupos filogenéticos divididos em dois agrupamentos fundamentais: filogrupos B2, G, F e D; e filogrupos A, B1, C e E (Denamur et al., 2021). Entre os quais: A, B1, B2 e D representam a maioria das cepas, e as outras quatro (C, E, F e G) são mais raras (Lu et al., 2016; Beghain et al., 2018; Clermont et al., 2019). As *E. coli* patogênicas também podem ser divididas em dois grupos principais, conforme

seus patótipos: *Escherichia coli* intestinal patogênica (InPEC) e *Escherichia coli* extraintestinal patogênica (ExPEC). (Kaper et al., 2004; Riley, 2020).

Os ExPEC são classificados como: *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* causadora de sepse (SEPEC) e *Escherichia coli* associada à meningite neonatal (NMEC) (Kaper et al., 2004). Possuem uma grande variedade de fatores de virulência, como adesinas (fimbriais e não fimbriais), sideróforos, toxinas, invasinas, entre outros. Muitos desses fatores de virulência ocorrem combinados dentro da mesma cepa e atuam sinergicamente (Biran et al., 2018; Johnson et al., 2018). Pertencente a este grupo e caracterizada por seu hospedeiro, tem-se, ainda, a *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). (Manges et al., 2019; Desvaux et al., 2020; Riley, 2020).

As principais *Sequence Types* (STs) associadas às infecções causadas por *E. coli* extraintestinal em humanos, são as: ST131, ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648, ST73, ST410, ST393, ST354, ST12, ST127, ST167, ST58, ST617, ST88, ST23, ST117 e ST1193. Em animais de produção, as mais prevalentemente associadas às ExPEC são: as ST10, ST12, ST69, ST73, ST95, ST117, ST127, ST131 e ST405. (Riley, 2020).

Já as cepas InPEC são subdivididas em diversos patótipos, propostos por suas características diferenciais e genes de virulência essenciais que definem cada subgrupo, como *Escherichia coli* produtora de *Shiga* toxina (STEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC), *Escherichia coli* aderente-invasiva (AIEC). Cada uma delas detêm propriedades distintas de virulência, incluindo adesinas, produção de toxinas e fatores de colonização. (Kaper et al., 2004; Riley, 2020).

As diferentes cepas de *E. coli* podem causar, tanto patologias extraintestinais (infecções do trato urinário – ITUs –, diversas infecções intra-abdominais, pulmonares, da pele e tecidos moles, meningite neonatal – NBM – e bacteremia), como patologias intestinais (várias formas de diarreia, incluindo síndrome hemolítica e urêmica – SHU). Essas infecções podem ser muito comuns (ITUs) (Izzo et al., 2011), ligadas à alta morbidade (insuficiência renal em SHU) em crianças

(Kolenda et al., 2015), sequelas neurológicas em NBM (Bouillon et al., 2018) e alta mortalidade (~15% em bacteremia. (Antão et al., 2008; Hutton et al., 2018).

Nos animais, a *E. coli* é uma das principais causas de diarreia, juntamente com outros agentes patogénicos, tais como: rotavírus, coronavírus, *Cryptosporidium parvum*, ou uma combinação destes (Izzo et al., 2011). Estas *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) se ligam e colonizam o epitélio intestinal através de adesinas no contexto de *fimbriae*, tais como: o F4 (anteriormente designado K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, e F18 *fimbriae* (Kolenda et al., 2015). Além disso, fimbrias do tipo I – F1 – sensíveis à manose estão presentes em quase todas as espécies de *E. coli* (incluindo K12). As ETEC também produzem várias enterotoxinas, entre as quais: toxinas termolábeis, termoestáveis e/ou termoestáveis enteroagregativas (EAST-1), que causam diarreia (Poirel et al., 2018). As ETEC afetam várias espécies animais, especialmente animais jovens, produtores de alimentos, como leitões, terneiros e frangos. A diarreia é observada em suínos e terneiros durante os primeiros três a cinco dias de vida e, em suínos de três a dez dias após o desmame (Poirel et al., 2018). A tendência ao desmame precoce, em vários países e continentes, tem o potencial de desempenhar um papel significativo no aumento da ocorrência de diarreia pós-desmame no setor da suinocultura. Como consequência, as infecções letais por ETEC em animais podem ocorrer, igualmente, como resultado da desidratação grave e de desequilíbrio eletrolítico. As infecções com *E. coli* em animais não se limitam aos jovens indivíduos, ocorrem, identicamente, em adultos. Como mencionado acima, a *E. coli* patogênica extraintestinal é responsável por infecções do trato urinário, particularmente em animais de companhia. (Bouillon et al., 2018; Hutton et al., 2018).

A *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC) é um patotipo zoonótico de grande interesse, reconhecido como uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos que ameaçam saúde pública e segurança alimentar em todo o mundo (Croxen et al., 2013; Ori et al. 2018; Gonzalez et al., 2020). As cepas produtoras de toxinas *Shiga* são capazes de causar doenças graves em humanos quando transmitidas por meio da cadeia alimentar de seus reservatórios animais (Gonzales et al., 2020). As cepas STEC já foram recuperadas de fezes do intestino de um numeroso grupo de animais, entre eles aves domésticas e silvestres. No entanto, seu papel como agente causador da doença tem sido especialmente associado ao consumo de carne bovina, seguido por carne suína (Kintz et al., 2017;

Smith et al., 2018; Scott et al., 2020). Na maioria dos animais, a *E. coli* STEC pode ser transportada e excretada na ausência de doenças. Além disso, relatos de doenças têm sido descritas relacionadas ao consumo de hortaliças, frutos do mar e produtos prontos para o consumo, entre outros alimentos. (Erickson et al., 2007; Prakasan et al., 2018; Torres et al., 2018).

Referente aos genes de virulência, estão localizados em elementos genéticos móveis, como ilhas genômicas, bacteriófagos, sequências de inserção (SI), integrons, plasmídeos e transposons; por isso, logram ser facilmente trocados entre diferentes cepas (Hacker et al., 2003; Dobrindt et al., 2010). As *E. coli* patogênicas são responsáveis por cerca de 209.500 mortes por ano em todo o mundo (Lozano et al., 2012). Ainda, estes elementos genéticos são agentes que carregam vários genes de resistência a antimicrobianos que estão sob forte pressão seletiva como resultado do uso extensivo de antibióticos. (Brzuszkiewicz et al., 2009).

3.5.1 Mecanismos de Resistência em *E. coli*

A Organização Mundial da Saúde Humana (OMS) e Animal (OIE – Organização Mundial de Saúde Animal) têm recomendado a inclusão da *E. coli* em programas de vigilância e monitoramento de resistência dada a sua importância. (WHO, 2017; OIE, 2019).

Devido às suas características de plasticidade genética e abundância, a *E. coli* é utilizada como marcador em estudos de diversidade e de reservatórios de genes de resistência no ambiente do *One Health*. Sua vasta distribuição no ambiente e presença no trato gastrointestinal de homens e animais faz com que ela venha sendo cada vez mais empregada em estudos de disseminação da resistência microbiana. (Leimbach et al., 2013; Braz et al., 2020).

A multirresistência em *Escherichia coli* tornou-se uma questão preocupante que é cada vez mais observada não somente na medicina humana, mas também na medicina veterinária no mundo todo. *E. coli* é intrinsecamente suscetível a quase todos os agentes antimicrobianos clinicamente relevantes, porém, ela possui grande capacidade de acumular genes de resistência, principalmente por meio de transferência horizontal. (Poirel et al., 2018).

Os agentes antimicrobianos têm um grande impacto na microbiota intestinal onde a *E. coli* reside. Ela é suscetível a todas as condições ambientais do órgão, como o tipo de ração consumido e o uso de aditivos e intensificadores de desempenho pelos animais de produção (Rochelle-Newall et al., 2015). Desse modo, as bactérias presentes na microbiota dos animais de produção são amplamente consideradas como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos e têm servido como indicadores para estimar a carga de resistência antimicrobiana em animais e outros setores numa perspectiva de Saúde Única. (Hu et al., 2016).

Os genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{CTX-M-15} já foram encontrados em amostras de água coletadas em Bangladesh, em 2012 (Toleman et al., 2015), e a *E. coli* foi a espécie carreadora de *bla*_{NDM-1} em três das sete regiões amostradas no estudo, fato de grande dimensão epidemiológica. (Pitout, 2012).

Um estudo realizado na Suíça investigou a presença do gene *mcr-1* em vegetais importados de outros países. Dois isolados de *E. coli mcr-1* positivos pertencentes aos clones ST167 (clone ExPEC) e ST4683 foram descobertos entre *Enterobacteriaceae* (3,3%) produtoras de *Extended-spectrum β-lactamases* (ESBL) (Zurfluh et al., 2019). Este fato sugere que o comércio internacional de alimentos vegetais é uma rota potencial para disseminação de cepas de *E. coli* multirresistentes.

Significativos genes de resistência transferidos por plasmídeos, como *bla*_{NDM-1}, que confere resistência aos carbapenêmicos, e o gene de resistência à colistina *mcr-1*, têm sido encontrados em cepas bacterianas de humanos e animais (Shaheen et al., 2013; Delgado-Blas et al., 2016; Liu et al., 2016a). Isso é motivo de grande preocupação, pois estes antimicrobianos são sempre considerados como medicamentos de última escolha para tratar infecções humanas causadas por patógenos multirresistentes. (Livermore et al., 2012; Shaheen et al., 2013; Codjoe et al., 2017). Cabe salientar que a resistência aos carbapenêmicos tem sido encontrada, sobremaneira, em isolados humanos, e pouco reconhecida em animais.

Por outro lado, a resistência à colistina em *E. coli* parece estar relacionada ao uso da colistina na medicina veterinária em escala mundial. Para as outras características de resistência, a transferência cruzada entre os humanos e animais ainda carece de elucidação. (Poirel et al., 2018).

Tanto a *E. coli* comensal, quanto a patogênica, foram implicadas na transferência de genes de resistência para outras bactérias (Adenipekun et al., 2015).

Haja vista a sua presença em uma ampla gama de hospedeiros, a *E. coli* é considerada um indicador útil para a análise de prevalência de resistência a antibióticos, permitindo avaliar e comparar a ocorrência de resistência entre diferentes populações e analisar a transmissão animal-humano (Alonso et al., 2017b). Frente a isso, a *E. coli* foi relatada como um reservatório de genes de resistência a antibióticos que podem ser transferidos de animais para humanos e fornecem informações vitais sobre o fluxo de resistência na cadeia alimentar. (Verraes et al., 2013; Allen et al., 2014).

Os mecanismos mais importantes frequentemente encontrados em *E. coli* correspondem à aquisição de genes que codificam para enzimas como *Extended-spectrum β -lactamases* – ESBL (conferindo resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações), carbapenemases (dando resistência aos carbapenêmicos), 16S rRNA metilases (conferindo pan-resistência a aminoglicosídeos), resistência a quinolonas mediada por genes plasmidiais (PMQR) (que aferem resistência a fluoroquinolonas) e genes *mcr* (que oferecem resistência às polimixinas). (Poirel et al., 2018).

3.5.1.1 Resistência aos β -lactâmicos em *E. coli*

Antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos interferem na síntese da parede celular bacteriana, resultando na inibição do crescimento bacteriano, ligando-se às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que são enzimas envolvidas na síntese de peptidoglicano. Os antibióticos β -lactâmicos são usados para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Todos eles compartilham, como estrutura comum, um anel lactâmico de quatro membros, conhecido como anel β -lactâmico. (Davies et al., 2010). Os antibióticos β -lactâmicos atuam na formação da parede celular bacteriana, interferindo nas proteínas ligantes de penicilina (PBPs) no estágio final da síntese de peptidoglicanos. (Davies et al., 2010).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos pode ocorrer através dos sistemas de efluxo e perda de porinas que irão influenciar na permeabilidade das membranas; a partir da alteração da estrutura do peptidoglicano; em razão das mutações nas proteínas ligantes de penicilina (PBPs), levando à diminuição da afinidade da ligação do antibiótico ao local de ação; e por intermédio dos mecanismos

enzimáticos de degradação do antibiótico. A degradação do antibiótico mediada por enzimas β -lactamases, que quebram o anel β -lactâmico, são mecanismos mais comuns e importantes em bactérias Gram-negativas. (Dzidic et al., 2008).

Antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, em especial as cefalosporinas de terceira e quarta gerações, são utilizados como primeira escolha no tratamento para as infecções causadas por enterobactérias. São seguros e eficazes e tornaram-se uma das classes de agentes antibacterianos mais amplamente prescritos. (Davies et al., 2010; Bush, 2016).

Entretanto, nota-se que há um aumento da resistência a estes antimicrobianos, mediado pela produção de enzimas chamadas de ESBL, que além de conferir resistência às cefalosporinas, dão resistência a maioria dos β -lactâmicos, à exceção de carbapenêmicos, cefamicinas e inibidores de β -lactamases, como clavulanato e tazobactam. (Tsai et al.; 2011; Lupo et al., 2013; Adler et al., 2016).

A classificação de Bush-Jacoby divide as enzimas β -lactamases em quatro grupos de acordo com suas atividades funcionais, relacionando sua estrutura com o espectro de ação dos antimicrobianos hidrolisados: penicilinases, ESBLs, carbapenemases e AmpC *type* cefalosporinases, além de seus vários subgrupos (Bush et al., 2010; Zhou et al., 2007). Alguns exemplos de β -lactamases já relatadas na medicina veterinária encontram-se na Tabela 1, com destaque para as ESBLs.

O grupo 1, também chamado de cefalosporinases, tem a cefalosporinas como substrato preferencial. Grupo 2, β -lactamases de espectro estendido, é o maior grupo e possui como substrato todos os antibióticos β -lactâmicos. Esse grupo é chamado de serina β -lactamases e é dividido em diferentes subgrupos em função dos diferentes espectros de ação de cada enzima. Os principais genes codificadores de β -lactamases estão nos subgrupos 2b, 2be, 2br, 2d, 2de, 2df e 2f. O grupo 3, composto pelas metalo- β -lactamases, é diferente dos outros dois grupos, uma vez que essas enzimas utilizam o zinco como cofator e tem os carbapenêmicos como substrato preferencial (Bush e Jacoby 2010).

Tabela 1. Principais β -lactamases encontradas em animais.

Genes	País de Origem	Fonte	Referência
bla_{CTX-M-1}	Dinamarca, Suíça, França, Alemanha, EUA	Suíno, Frango, gado, bovino de leite, cão, gato, cavalo	Randall et al., 2011; Endimiani et al., 2012; Börjesson et al., 2013; Hammerum et al., 2014; Liu et al., 2016b
bla_{CTX-M-2} , bla_{CTX-M-8}	Brasil	Frango	Lentz et al., 2019
bla_{CTX-M-14}	França, China	Bovinos de leite, suíno, frango, cão	Dahmen et al., 2013; Liao et al., 2015; Liu et al., 2016c.
bla_{CTX-M-15}	Reino Unido, Países Baixos, Alemanha, México, França, Espanha, Espanha, EUA, China, Nigéria	Frango, cão, animais de produção, bovinos de leite, cavalo, gato, ave silvestre	Ewers et al., 2010, 2014; Randall et al., 2011; Berthe et al., 2013; Hordijk et al., 2013; Rocha-Gracia et al., 2015; Falgenhauer et al., 2016; Liu et al., 2016b; Liu et al., 2016c; Ojo et al., 2016; Timofte et al., 2016; Freitag et al., 2017
bla_{SHV-2a} , bla_{SHV-18}	Brasil	Frango	Lentz et al., 2019
bla_{SHV-12}	Espanha, Alemanha, China	Aves silvestres, cão, frango	Liu et al., 2016c; Alonso et al., 2017b
bla_{CMY-2}	Alemanha, Espanha, Dinamarca, França, Portugal, Suíça, Brasil, EUA, China, Japão	Cão, ave silvestre, frango e carne de frango, gado	Park et al., 2012; Loncaric et al., 2013; Ohnishi et al., 2013; Guo et al., 2014; Sato et al., 2014; Vogt et al., 2014; Alcalá et al., 2016; Hansen et al., 2016; Jones-Dias et al., 2016; Maamar et al., 2016; Cunha et al., 2017; Schill et al., 2017; Lentz et al., 2019
bla_{NDM-1}	China, U.S	Cão, gato, suíno	Shaheen et al., 2013; Lin et al., 2016; Cui et al., 2017
bla_{NDM-5}	China, Algeria, Índia	Cao, suíno, gado, pato	Kitchel et al., 2009; Yaici et al., 2016; Yousfi et al., 2016; Kong et al., 2017

bla _{VIM-1}	Alemanha	Frutos do mar, suínos	Fischer et al., 2012; Fischer et al., 2017; Roschanski et al., 2017a; Roschanski et al., 2017b
bla _{IMP-4}	Austrália	Gaivota	Dolejska et al., 2016
bla _{OXA-48}	Alemanha, França, EUA, Líbano e Algéria	Cão, gato, frango	Stolle et al., 2013; Al Bayssari et al., 2015; Liu et al., 2016b; Melo et al., 2017
bla _{OXA-181}	Itália	Suínos	Pulss et al., 2017
bla _{KPC-2}	Brasil	Cão	Sellera et al., 2018

Fonte: O autor, adaptado de Poirel et al. (2018).

Os genes que codificam as β -lactamases são encontrados, sobretudo, em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, e são detectados em diferentes isolados e amostras. Esses genes são extensamente relatados em bactérias clínicas (Bush et al., 2010); tal qual há relatos em bactérias ambientais (Pitondo-Silva et al., 2016; Furlan et al., 2018). Existem várias descrições em suínos, aves, bovinos, solo, vegetais e água. (Ewers et al., 2012; Ben Said et al., 2016; Furlan et al., 2018).

A produção de ESBLs, AmpCs β -lactamases e carbapenemases são mecanismos de resistência aos antimicrobianos muito importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico em *Enterobacteriales* (Friedman et al., 2016; Wilson et al., 2018). As ESBLs estão incluídas no grupo 2be, na classificação de Bush-Jacoby. Já há diversas famílias, como: TEM-, SHV-, CTX-M- PER-, VEB- (Bush et al., 2010). Mais de 541 ESBLs já foram referidas. Na atualidade, as famílias de ESBLs mais predominantemente encontradas são: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, sendo que até dezembro de 2021, 167 variantes de TEM, 132 de SHV e 242 de CTX-M tinham sido publicadas no banco de dados Lahey. (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>).

O uso intensivo e indevido de antibióticos β -lactâmicos, tanto na medicina humana, quanto na veterinária, levaram à disseminação de bactérias resistentes produtoras de ESBL. Infecções causadas por cepas produtoras de ESBL estão entre as ameaças mais sérias e críticas do século XXI, uma vez que estão correlacionadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. (ECDC, 2014; Abayneh et al., 2018; Walker et al., 2018; Bergšpica et al., 2020).

Genes de ESBL e AmpC estão sendo encontrados abundantemente em bactérias comensais provenientes de amostras de fezes de animais de produção, assim como em animais de companhia. (Dierikx et al., 2013; Haenni et al., 2014; Hordijk et al., 2013). Altas taxas de prevalência foram encontradas em *E. coli* produtoras de ESBL/AmpC, tais como em terneiros na Europa, e frangos no mundo todo. Provavelmente este seja um resultado da pressão de utilização de cefalosporinas como ceftiofur, impactando sobre a microbiota comensal destes animais (Poirel et al., 2018).

Um dos maiores grupos de ESBL são as enzimas CTX-M. Estudos recentes de epidemiologia realizados no Brasil, mostram que CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-15 são as variantes predominantes no país. (Irrgang et al., 2017; Cyoia et al., 2019; Daga et al., 2019; Soncini et al., 2021).

Antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos são o tratamento de escolha para infecções graves motivadas por organismos produtores de ESBL em humanos. (Kang et al., 2004; Paterson et al., 2005).

Contudo, a produção de carbapenemases em isolados clínicos de bacilos Gram-negativos (BGN) é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos e, é apontado como uma das ameaças mais preocupantes descritas pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), sob o ponto de vista clínico, epidemiológico e de saúde pública. Normalmente, estes isolados clínicos possuem genes codificadores de suas enzimas que estão localizados em elementos genéticos móveis, facilitando, dessa maneira, a transferência da resistência (CDC, 2013-2008). São enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos e, usualmente, conferem resistência a grande parte dos antimicrobianos β -lactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas (Nordmann et al., 2002; Queenan et al., 2007). As penicilinas, todavia, são excelentes substratos para qualquer tipo de β -lactamases, incluindo carbapenemases, e, portanto, seu uso pode contribuir para uma pressão de seleção de qualquer forma.

O primeiro determinante de carbapenemases identificado em um animal isolado de *E. coli* foi VIM-1, recuperado de um suíno, na Alemanha (Fischer et al., 2017). Desde então, outros foram identificados isolados de *E. coli* produtores de VIM-1 em diferentes fazendas de suínos no mesmo país (Fischer et al., 2012, Guerra et al., 2014). Esta carbapenemase até agora nunca foi encontrada em outro lugar em isolados de animais. Outras carbapenemases identificadas em *E. coli* são: NDM-1 e NDM-5. NDM-1 foi identificada nos Estados Unidos e na China, em isolados recuperados de cães, gatos e suínos (Shaheen et al., 2013; Wang Y et al., 2017). NDM-5 também foi detectada na China, Índia e Argélia, a partir de bovinos, aves, cães, gatos e peixes (Liu Z et al., 2017; Yousfi et al., 2016). O gene que codifica IMP-4 foi identificado em isolados de *E. coli* recuperados de gaivotas na Austrália (Dolejska et al., 2016). Curiosamente, a OXA-48, que é a mais prevalente carbapenemase em isolados de enterobactérias humanas na Europa, foi encontrada em isolados de *E. coli* recuperados de cães, gatos e galinhas na Alemanha, França, Líbano, Argélia e Estados Unidos (Stolle et al., 2013; Schmiedel et al., 2014; Al Bayssari et al., 2015; Melo et al., 2017). Embora a classe A β -lactamase KPC seja uma das carbapenemases mais comumente identificadas em humanos, ela tem sido pouco relatada em isolados de *E. coli* de animais provenientes de animais (Munoz-Price et

al., 2013; Mollenkopf et al., 2017), exceto por um único isolado portador de *bla*_{KPC-2} de um cão, no Brasil, que sofreu de uma infecção do trato urinário (Sellera et al., 2018). Fora isso, *bla*_{VIM-1} foi recentemente relatado em amostras de carne suína, na Bélgica (Garcia-Graells et al., 2020), e KPC-2 e KPC-3 foram recentemente reportadas em aves silvestres, na África. (Ben Yahia et al., 2020).

Apesar da importância clínica e epidemiológica que possui, a detecção de carbapenemases fora do ambiente hospitalar permanece baixa. Raramente elas são identificadas em isolados de *E. coli* provenientes de animais (Poirel et al., 2018). Cabe salientar que carbapenêmicos não são habitualmente utilizados e prescritos em Medicina Veterinária. Somente em alguns em casos raros, são utilizados em animais de companhia. Dessa forma, a ocorrência de carbapenemases em animais é incomum, logo, esse ambiente não corresponde a um reservatório expressivo destes genes. (Poirel et al., 2014, 2018).

3.5.1.2 Resistência a quinolonas

Quinolonas e fluoroquinolonas são importantes agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de vários tipos de infecções em humanos e em animais (Pham et al., 2019). Em 1962, surgiram as quinolonas de primeira geração, que tem como alguns dos exemplares as substâncias flumequina, ácido nalidíxico e ácido oxolínico. (Brar et al., 2020).

A partir de seu surgimento, elas foram rapidamente utilizadas para combater infecções urinárias de difícil tratamento. Na década de 1980, um novo grupo foi sintetizado, caracterizado pela adição de um átomo de flúor à molécula, assim apareceram as chamadas fluoroquinolonas ou quinolonas de segunda geração. Seu espectro de ação ampliou-se, combatendo não unicamente bactérias Gram-negativas, mas algumas espécies de Gram-positivas (Goldstein, 1996; King et al., 2000; Zhanel et al., 2002). Enrofloxacino, norfloxacino e ciprofloxacino estão entre os exemplares cruciais da chamada segunda geração de quinolonas (Van Hoek et al., 2011). Quinolonas de terceira e quarta geração foram sintetizadas desde então, têm seu uso mais restrito, principalmente as de quarta geração, cuja ação se restringe ao ambiente hospitalar humano. (Spinosa et al., 2011).

A resistência teve sua emergência com o uso clínico e transformou-se comum em alguns patógenos bacterianos. Os mecanismos de resistência às quinolonas incluem duas categorias de mutação (i; ii) e a aquisição de genes que conferem resistência (iii) como segue: i) o acúmulo de mutações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV; ii) uma diminuição da concentração intracelular de fluoroquinolonas por regulação negativa das porinas ou modificação da atividade das bombas de efluxo; iii) a aquisição de genes de resistência através de plasmídeos. (Jacoby, 2005, Redgrave et al., 2014; Hooper et al., 2015).

Quinolonas são usadas para tratar infecções bacterianas provocadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo, porém, não se limitando a infecções do trato urinário (ITUs), pielonefrite, gastroenterite, doenças sexualmente transmissíveis, como gonorreia, tuberculose (Gillespie, 2016), prostatite, pneumonia adquirida na comunidade e infecções da pele e dos tecidos moles (Oliphant et al., 2002; Aldred et al., 2014). O primeiro gene descoberto transferível por plasmídeo foi denominado *qnrA*, que foi seguido pelo isolamento de vários genes relacionados. Cerca de 100 variantes de genes *qnr* foram revelados nomeadamente em membros da família Enterobacteriaceae, e agrupados em cinco famílias distintas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*. (Martínez-Martínez et al. 1998; Nordmann et al., 2005; Strahilevitz et al., 2009; Jacoby et al., 2014; Hooper et al., 2015).

Um segundo gene de resistência mediado por plasmídeo (PMQR) foi através da detecção da proteína mutante AAC(6')-Ib-cr. (Robicsek et al., 2006).

O terceiro mecanismo foi localizado em 2007, com as bombas de efluxo de quinolonas, achado mediado por plasmídeo *qepA*. (Yamane et al., 2007; Périchon et al., 2007) e *oqxAB* (Hansen et al., 2007).

PMQRs foram amplamente identificados entre isolados humanos, e entre isolados animais. Na China, estudos mostraram altas prevalências dos determinantes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* entre animais produtores de alimentos (Ma et al., 2009; Liu et al., 2012), e alguns estudos destacaram um aumento da prevalência ao longo dos anos. (Huang et al., 2009; Poirel et al., 2018).

Uma investigação retrospectiva realizada em toda a Europa identificou genes *qnrS1* e *qnrB19* em isolados de *E. coli* em animais produtores de alimentos, como frangos, bovinos e suínos (Veldman, et al., 2011; Poirel et al., 2018). PMQRs

também foram observados em animais de companhia. (Umeda, 2020; e animais de produção (Doma, 2020).

Além disso, a presença de genes *qnr* em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL foram relatados na Europa, Estados Unidos, Ásia e África (Poirel et al., 2006; Guessennd et al., 2008; Lavilla et al., 2008; Bouchakour et al., 2010; Silva-Sanchez et al., 2013). Alguns estudos encontraram uma forte associação entre isolados positivos para *qnr* e ESBL. (Nordmann et al., 2005; Jacoby et al., 2006; Robicsek et al., 2006; Moumouni et al., 2017).

3.5.1.3 Resistência às polimixinas mediada por plasmídeo

Polimixinas são antibióticos polipeptídicos usados como último recurso para tratar infecções causadas por BGN resistentes a carbapenêmicos. Por efeito da sua alta neurotoxicidade e nefrotoxicidade, quando administradas sistematicamente em humanos, as polimixinas foram gradualmente substituídas por antimicrobianos menos tóxicos na década de 1970. (Li et al., 2006).

A ação das polimixinas acontece por meio da interação com os lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios da parede celular (membrana externa) de bactérias Gram-negativas. Elas agem desestabilizando o LPS através da troca de cátions (Ca^{+2} e Mg^{+2}) e, dessa forma, aumentam a permeabilidade da parede bacteriana, gerando o extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequente morte da célula. Independentemente de o LPS ser o alvo principal das polimixinas, seu mecanismo de ação exato ainda não foi completamente elucidado. (Zavascki et al., 2007; Poirel et al., 2017a).

As polimixinas possuem duas formas de apresentação que são a colistina (polimixina E) e polimixina B, e são moléculas ativas contra a maioria dos microrganismos da ordem *Enterobacterales*. A prática terapêutica com polimixinas contra bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., possui resultado significativo. As polimixinas não possuem espectro de ação contra cocos Gram-negativos, bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbias. (Sader et al., 2015; Poirel et al., 2017a).

Algumas espécies de BGN, como *Burkholderia mallei*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Legionella* spp.,

Morganella morganii, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., e *Vibrio cholerae* são intrinsecamente resistentes às polimixinas.

Até novembro de 2015, a resistência às polimixinas era caracterizada por mutações cromossômicas. No final deste ano, Liu e colaboradores reportaram, na China, pela primeira vez, o gene denominado *mobile colistin resistance (mcr-1)* que confere resistência às polimixinas e é mediado por plasmídeo, em isolados bacterianos de animais e humanos da família *Enterobacteriaceae* (Liu et al., 2016). O gene *mcr* codifica uma fosfoetanolamina transferase, que modifica o lipopolissacarídeo adicionando fosfoetanolamina ao lipídeo A, reduzindo a carga aniônica do LPS e, subsequentemente, a sua afinidade às polimixinas. (Liu et al., 2016).

Os isolados de *E. coli* que carregam o gene *mcr-1* fazem parte de diferentes STs (Rumi et al., 2019; Loayza-Villa et al., 2020). Sua disseminação não está associada a uma linhagem clonal específica e nem a um grupo de plasmídeos, sendo que esta ampla flexibilidade molecular facilita muito sua disseminação (Li et al., 2016; Wang Q et al., 2017, 2018). Desde seu primeiro relato, *mcr-1* é mencionado em isolados humanos, animais e ambientais, bem como em amostras de alimentos em todos os continentes, exceto na Antártica (Liu et al., 2016; Elbediwi et al., 2019; Matamoros et al., 2017). Tem sido encontrado em diferentes espécies bacterianas, em plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade. Plasmídeos do tipo IncI2 e IncX4 são os mais prevalentes e já foram detectados em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *C. braakii* e *C. sakazakii*, isolados de várias fontes, como humanos, animais e ambientes de produção, vida selvagem e vários outros ambientes (águas residuais, água de poço, solo, estrume, rios etc.). (Guenther et al. 2017; Zhou et al., 2017; Poirel et al., 2018; Andrade et al., 2020).

Atualmente, *E. coli* é a espécie mais reiteradamente encontrada, carregando o gene *mcr-1* em isolados no mundo todo. A ST10 e outras cepas pertencentes ao complexo clonal CC10 são as mais prevalentes associadas à disseminação deste gene. (García-Meniño et al., 2018, 2019, 2021; Tang et al., 2019; Hsueh et al., 2020; Khanawapee et al., 2020; Migura-Garcia et al., 2020; Wang Y et al., 2020; Nakano et al., 2021).

A resistência mediada através do gene *mcr-1* tem sido predominantemente reportada em isolados de origem animal. Provavelmente devido ao fato da colistina ter seu uso muito maior neste grupo do que em seres humanos. Desde 1980, é utilizada nos sistemas de produção e a descrição mais antiga de *mcr-1* data deste mesmo ano em isolado de frango, na China. (Shen et al., 2016; Skov et al., 2016; Nordmann et al., 2016).

Ao contrário de seu uso na medicina humana, a colistina é extensivamente utilizada na medicina veterinária por décadas para tratamento e/ou prevenção de doenças infecciosas, ou como aditivo alimentar visando a promoção de crescimento em animais. (Poirel et al., 2017).

Mesmo com suas limitações, em resposta ao rápido crescimento de bactérias resistentes na última década, a reintrodução das polimixinas na terapêutica humana para tratar infecções graves foi imprescindível ao combate por patógenos Gram-negativos multirresistentes como *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* em humanos. (Munoz-Price et al., 2013; Poirel et al., 2017).

Nas últimas décadas, vem se empregando a colistina no tratamento de infecções em humanos e, por isso, os mecanismos de resistência mediados por plasmídeos, despertaram grande preocupação.

Dados sobre resistência à colistina em animais de produção na América do Norte são escassos, pois a colistina não está bastante disponível na pecuária nestas regiões (EMA/AMEG, 2016). Atualmente, as taxas mais altas de resistência à colistina entre isolados de animais de produção dizem respeito a maior pressão de seleção imposta pelo uso intensivo da colistina na prática veterinária. Um estudo realizado em 26 países europeus indica associações estatisticamente positivas entre o consumo de polimixinas em animais produtores de alimentos e resistência à colistina em isolados de *E. coli*. (García et al., 2018).

Com base nos dados de resistência disponíveis, a ocorrência de resistência à colistina entre isolados de animais produtores de alimentos é de 0,9-76,9%, bem mais frequente do que em isolados humanos (0,1-8,8%). (Liu et al., 2018).

Até o momento, 32 variantes de *mcr-1* já foram contabilizadas, conforme o GenBank (fevereiro-2022) (*mcr-1.1* até *mcr-1.32*) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:\(mcr-1\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:(mcr-1))), diferindo em

apenas em um nucleotídeo do gene *mcr-1*. Outros dez genes *mcr* foram descritos ao redor do mundo (Tabela 2).

Tabela 2. Primeiros relatos das variantes do gene *mcr* distribuídas no mundo.

Gene	Espécie	País	Fonte	Referência
<i>mcr-1</i>	<i>E. coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	Carne frango, suíno, isolado clínico	Liu et al., 2016
<i>mcr-2</i>	<i>E coli</i>	Bélgica	Suínos, Bezerros	Xavier et al., 2016
<i>mcr-3</i>	<i>E. coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> <i>Salmonella</i>	Ásia e EUA	suíno	Yin et al., 2017
<i>mcr-4</i>	<i>S. enterica</i> <i>E. coli</i>	Itália Espanha e Bélgica	suíno	Carattoli et al., 2017
<i>mcr-5</i>	<i>S. enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Paratyphi B</i>	Alemanha	frango	Borowiak et al., 2017
<i>mcr-6</i>	<i>Moraxella</i>	Grã-Bretanha	suíno	AbuOun et al., 2017
<i>mcr-7</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	frango	Yang et al., 2018
<i>mcr-8</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	frango, suíno, isolado clínico	Wang R et al., 2018
<i>mcr-9</i>	<i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium	EUA	isolado clínico	Carroll et al., 2019
<i>mcr-10</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	China	isolado clínico	Wang C et al., 2020

Fonte: O autor.

Os genes *mcr* têm sido descritos, principalmente, em BGN fermentadores. No entanto, *mcr-1* e *mcr-4* também foram relatados em *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (apenas *mcr-1*). (Caselli et al., 2018; Martins-Sorenson et al, 2019).

Moraxella spp., que são bactérias Gram-negativas comensais e patogênicas, frequentemente encontradas em animais como bovinos, ovelhas, gatos, cães, coelhos e suínos, são vistas como reservatório natural do gene *mcr*. Genes *mcr-1* e *mcr-2* apresentam grau de similaridade elevado com alguns genes cromossômicos

intrínsecos do gênero. Apesar disso, as espécies exatas que tenham atuado como progenitoras dos genes *mcr-1* e *mcr-2* ainda não foram determinadas (Poirel et al., 2017b). Outra característica importante que sugere origem animal para o gene é a presença de coprodutores de resistência específicos para medicamentos de uso veterinário, como o florfenicol, cuja resistência é identificada pelo gene *flor*. (Kieffer et al., 2017).

A presença do gene *mcr-1* vem sendo associada a isolados que carregam outros genes de resistência como as ESBLs, tipo CTX-M, SHV e TEM, e/ou cefalosporinase AmpC, como CMY (Fernandes et al., 2016; Chen et al., 2019; Lentz et al., 2019; Mobasser et al., 2019). Genes de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) e carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{VIM}*) também são citados em isolados *mcr-1* positivos. (Delgado-Blas et al., 2016; Skov et al., 2016; Dalmolin et al., 2018; Dominguez et al., 2018; Schages et al., 2020; Solgi et al., 2020).

3.5.1.4 Elementos genéticos associados ao gene *mcr*

O gene *mcr-1* pode ser carregado por uma série de tipos de plasmídeos conjugativos e não conjugativos, incluindo IncX3, IncX4, um híbrido IncX3–X4, IncHI1, IncHI1, IncHI2, IncP, IncI2, IncF, IncFII, um híbrido IncI2–IncFIB, e IncY (Quiroga et al., 2019). Além disso, pode estar integrado no cromossomo de algumas espécies bacterianas (Saavedra et al., 2017). Estes plasmídeos tem sido implicados não somente na disseminação de *mcr*, mas também estão envolvidos na disseminação global de outros genes de resistência em enterobactérias de origem humana e animal (Campos et al., 2016; Tse et al., 2016). Os principais plasmídeos associados a disseminação mundial de *mcr-1* são os do tipo IncHI2, IncI2 e IncX4. (Shen et al., 2018; Wang et al., 2018).

Na América Latina, apenas quatro plasmídeos foram qualificados até agora: IncX4 (Fernandes MR et al., 2017), IncP (Garza-Ramos et al., 2018), IncI2 (Rumi et al., 2019) e IncHI2 (Faccone et al., 2020), sendo o plasmídeo IncX4 o mais frequente no Brasil. (Sacramento et al., 2018; Perdigão Neto et al., 2019).

Até o momento, quatro tipos de ambientes genéticos foram relatados associados à presença de *mcr-1*, e a maioria são sequências de inserção, como IS26, IS2, IS609, IS683, IS1294 e IS150 (Wang Y et al., 2017; Shen Y et al., 2018). IS*Apl1*

é o elemento normalmente encontrado adjacente a *mcr-1* em uma ou ambas as extremidades (Snesrud et al., 2017; Shen Y et al., 2018; Wang Q et al., 2018; Wang Y et al., 2017). IS*Ap11* pertence à família IS30 e foi primeiramente identificado em *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Este bacilo Gram-negativo da família de *Pasteurellaceae* é agente causador de pleuropneumonia necrótica em suínos. (Falgenhauer et al., 2016; Petrillo et al., 2016; Poirel et al., 2017b).

Algumas evidências sugerem que o gene *mcr* tem origem em isolados de animais. A primeira é representada pela mobilização relacionada a uma sequência de inserção inicialmente identificada em isolados de suínos que é a IS*Ap11*. Análises explicitaram que a sequência de inserção IS*Ap11* pode estar presente em um transposon composto (IS*Ap11*-*mcr-1*-IS*Ap11*) em plasmídeos do tipo IncHI2 (com tamanho de 200 kb), estando presente ou ausente em plasmídeos do tipo IncI2 (60 kb), e completamente ausente em plasmídeos do tipo IncX4 (30 kb).

O papel do IS*Ap11* na mobilização do gene *mcr-1* foi demonstrado *in vitro*, por transposição. Tem se suscitado que os eventos de recombinação associados à mobilização do *mcr-1* foram preliminarmente mediados por duas cópias de IS*Ap11*. (Snesrud et al., 2016).

O elemento móvel IS26 a montante do *mcr-1* também foi associado a plasmídeos do tipo IncX4 no Brasil, contudo, não há outros relatos na América Latina (Rau et al., 2020; Zamparette et al., 2020). No mundo, a IS26 já foi identificada em isolados da Estônia e na China. Esta Sequência de Inserção (SI) desempenha um papel essencial na disseminação e evolução da resistência antimicrobiana em plasmídeos, incluindo genes de resistência à colistina (Anyanwu et al., 2020). Supostamente, concerne à sua mobilização via unidades translocáveis ou pela formação de cointegrados, dado que já foi identificado em outros tipos de plasmídeos portadores de diferentes genes de resistência antimicrobiana. (Harmer et al., 2014, 2016, 2020; He et al., 2015, 2019; Liu BT et al., 2017; Vinué et al., 2020).

3.6 TIPAGEM MOLECULAR

Técnicas de tipagem molecular vêm se provando como uma ferramenta muito útil para estudos epidemiológicos, sendo fundamentais como instrumentos na investigação de surtos, pois permitem determinar as relações clonais entre os

isolados. São utilizadas com o objetivo de identificar a fonte de infecção, os tipos de patógenos microbianos envolvidos, e para realizar o controle, monitoramento e investigação da prevalência destas infecções num ambiente hospitalar. (Azimi et al., 2016; Johnson et al., 2016).

Clones de *E. coli* multirresistentes possuem grande distribuição e, nesse panorama, técnicas de genotipagem têm sido utilizadas como ferramentas na discriminação de isolados com fenótipos idênticos. As técnicas oportunizam, a partir das características de variabilidade genética, distinguir e/ou relacionar os microrganismos, em especial os da mesma espécie (Sabat et al., 2013; Ranjbar et al., 2014; Tümmler, 2020). Os resultados gerados oferecem dados importantes para a compreensão mundial ou local dos clones, contribuindo para o entendimento da epidemiologia molecular (Tartof et al., 2005; Rahimi et al., 2016; Sakai et al., 2016; Jeong et al., 2021). A genotipagem permite determinar a origem dos agentes patogênicos com altas taxas de virulência, transmissibilidade e resistência aos antimicrobianos.

A tipagem de *E. coli* é uma ferramenta útil para detectar a origem da cepa, se é mais prevalente em isolados humanos ou de animais. A exemplo disso, cita-se a ST131, que é uma das cepas mais importantes na clínica médica, devido à alta patogenicidade e associação com resistência a quinolonas e ESBLs (Nicolas-Chanoine et al., 2014). Entretanto ela já foi identificada em suínos, embora não seja comum. Um estudo de García Meniño e colaboradores, na Espanha (2018), identificou cepas ST131 responsáveis pela ocorrência de colibacilose entérica nos suínos. Adicionalmente, uma análise de macrorestrição foi realizada, comparando estes isolados com isolados humanos, e alguns deles apresentaram alta similaridade com isolados clínicos ($\geq 85\%$), sugerindo disseminação clonal desta cepa clinicamente relevante. (García-Meniño et al., 2018).

Diversos métodos de genotipagem têm sido empregados. Os métodos de tipagem molecular são baseados no uso de enzimas de restrição, de modo a clivar o DNA em fragmentos, e examinar o polimorfismo dos mesmos. A técnica de macrorestrição ou *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é muito adotada. Esta técnica é baseada na análise de fragmentos de DNA total obtidos pela clivagem por uma enzima de restrição denominada endonuclease e a separação dos fragmentos ocorre através da eletroforese em campo pulsado (Sabat et al., 2013; Ranjbar et al.,

2014; Salipante et al., 2015). Os perfis gerados são comparados segundo a quantidade e tamanho de bandas obtidas e pela similaridade dos perfis. PFGE já foi considerado como uma técnica "padrão-ouro" para tipagem molecular, por conferir alto poder discriminatório entre as cepas e reprodutibilidade.

Apesar disso, um de seus maiores limitantes é não poder realizar a comparação dos resultados entre outros laboratórios e países. É uma técnica que pode ser aplicada durante a ocorrência de uma investigação epidemiológica de um surto hospitalar, todavia, é bastante trabalhosa, demorada e tem limitações como necessidade de profissionais especializados, e possuir certa subjetividade em função da interpretação dos resultados gerados. (Sabat et al., 2013; Ranjbar et al., 2014; Salipante et al., 2015).

Os métodos de tipagem molecular baseados em técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) estão cada vez mais frequentes. Existem vantagens, como poder relacionar os resultados encontrados facilmente com estudos realizados em laboratórios de outros países, além de serem precisos, rápidos, reprodutíveis, sensíveis e confiáveis. (Mcdougal et al., 2003; Agius et al., 2007; Clermont et al., 2000).

Multilocus Sequence Typing (MLST) é um método altamente discriminatório para tipagem de cepas e caracterização de isolados com base nas análises das sequências de nucleotídeos de genes constitutivos conhecidos como *housekeeping*. Para *E. coli*, o esquema de Achtman utiliza os genes: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* (Wirth et al., 2006). As sequências de cada gene são denominadas alelos e cada alelo recebe um número, em que, por intermédio da combinação de alelos dos sete genes *housekeeping*, é possível classificar cada isolado como um tipo de sequência (ST), que define a origem evolutiva dos isolados. (Larsen et al., 2012; Sabat et al., 2013).

Aqueles que compartilham mais de seis alelos idênticos são agrupados em um mesmo complexo clonal, através da comparação com os alelos conhecidos em cada locus no banco de dados do MLST (Feil et al., 2004). Ressalta-se que a PubMLST (disponível em <https://pubmlst.org/>) é a plataforma própria para análise, e reúne informações de diferentes bancos de dados. Ainda, a pesquisa pode ser feita por meio da plataforma web *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (disponível em <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

As técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) possibilitam o sequenciamento completo do genoma (*Whole Genome Sequencing* – WGS) e é possível proceder a investigação de variantes com um alto poder discriminatório, além de adjectivar geneticamente o genoma completo. O desenvolvimento de NGS revolucionou a medicina. Não obstante sua grande evolução e rapidez com que os dados são executados, esta ferramenta ainda é considerada de alto custo e detém a necessidade de profissional altamente qualificado para a interpretação dos resultados.

Os métodos de tipagem molecular baseados na sequência de nucleotídeos podem ser aplicados tanto para técnicas geradas a partir sequenciamento Sanger, como também com os dados gerados a partir do WGS (Larsen et al., 2012).

Weissman e colaboradores propuseram uma nova técnica de tipagem molecular para *E. coli* fundamentada na amplificação de dois genes, ao invés de sete genes que são utilizados na técnica de MLST (Weissman et al., 2012). A técnica conhecida como CH *typing* utiliza um dos sete genes *housekeeping*, *fumC* (*fumarate hydratase*) e o gene *fimH* (*Type 1 fimbria D-mannose specific adhesin*) que está envolvido na codificação de fímbrias do tipo 1 (F1), responsável pela adesão celular em *E. coli*. Isso promoveu uma redução nos custos, menor tempo para a realização da técnica, uma vez que a técnica de MLST baseada na amplificação e sequenciamentos de sete genes é bastante trabalhosa e com custo elevado quando aplicada a um número grande de isolados. Inicialmente, os dados eram gerados a partir das reações de PCR, seguidas pelo sequenciamento *Sanger*, que precisavam ser alinhados com um banco de dados que contém as sequências já conhecidas, e só então a identificação acontecia (Roer et al., 2017). Posteriormente, as propostas de criação de duas *Web Tools FimTyper* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper/>) e *CHTyper* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/chtyper/>) disponibilizadas para livre acesso no CGE vieram facilitar mais a identificação das CHs. Elas garantiram que não somente sequências curtas geradas desde o Sanger, e sim os dados brutos ou montados gerados a partir do WGS pudessem ser utilizados para a determinação dos alelos. (Roer et al., 2018).

A técnica apoiada no *fumC/fimH* tem se correlacionado com STs específicos ou complexos clonais em mais de 90% dos casos e tem se mostrado uma ferramenta útil para triagem de isolados para o WGS (Roer et al., 2018). Clones de *Escherichia coli mcr-1* positivos provenientes de suínos foram caracterizados num

estudo realizado por García-Meniño e colaboradores, na Espanha (García-Meniño et al., 2018; 2019), através da técnica de CH typing *fumC/fimH*.

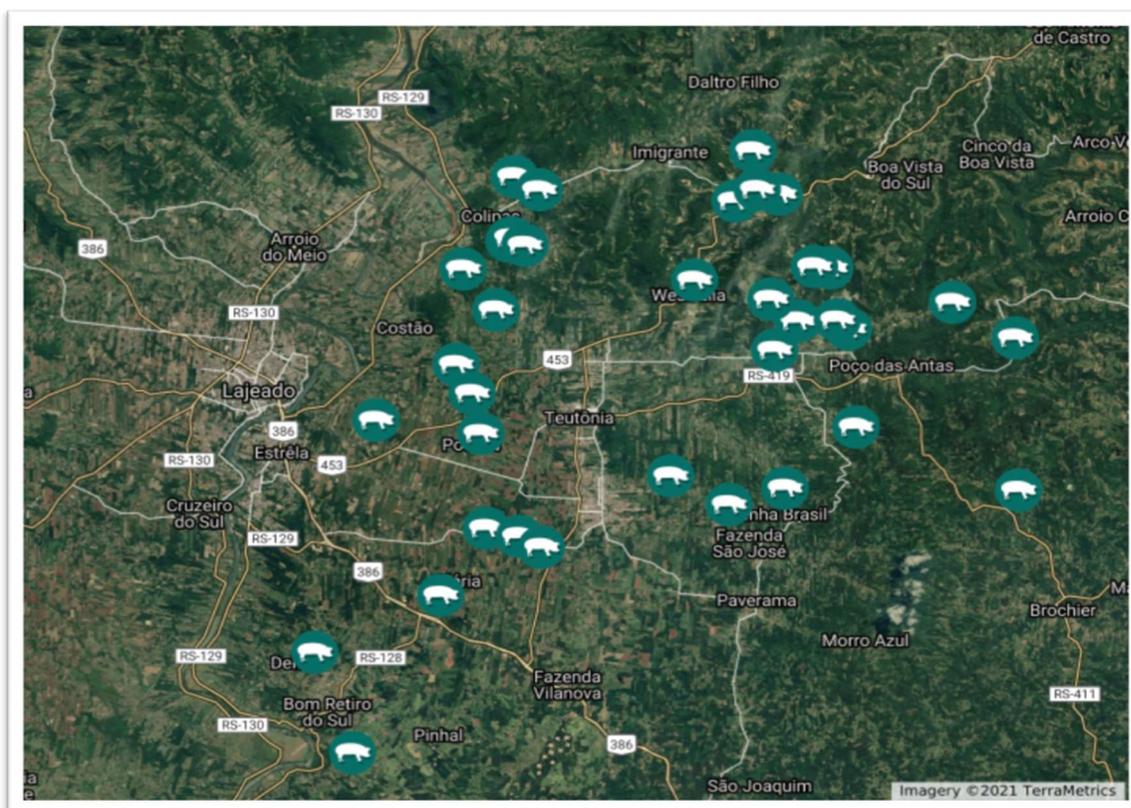
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

Este estudo foi do tipo transversal prospectivo realizado em 39 granjas distribuídas em oito cidades, no Rio Grande do Sul, no período de março a setembro de 2018. Os locais das coletas estão descritos na Figura 1.

A definição do número de amostras foi realizada juntamente ao Laboratório de Epidemiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O cálculo amostral considerou uma sensibilidade perfeita de 100%, prevalência de 1% e o nível de confiança de 90-95% para uma população infinita, para um tamanho médio de 600 animais em cada lote. Foram coletados seis suínos por lote (*swab* retal), em 46 lotes distintos para as análises microbiológicas. Além disso, foram coletadas amostras de ração (100g por lote) e de músculo (100g por lote) relacionados aos 46 lotes descritos.

Figura 1. Área de realização das coletas contendo a distribuição das granjas no Estado do Rio Grande do Sul.



A localização dos pontos de coleta encontra-se marcada pela figura dos animais no mapa.
Fonte: TerraMetrics (2021).

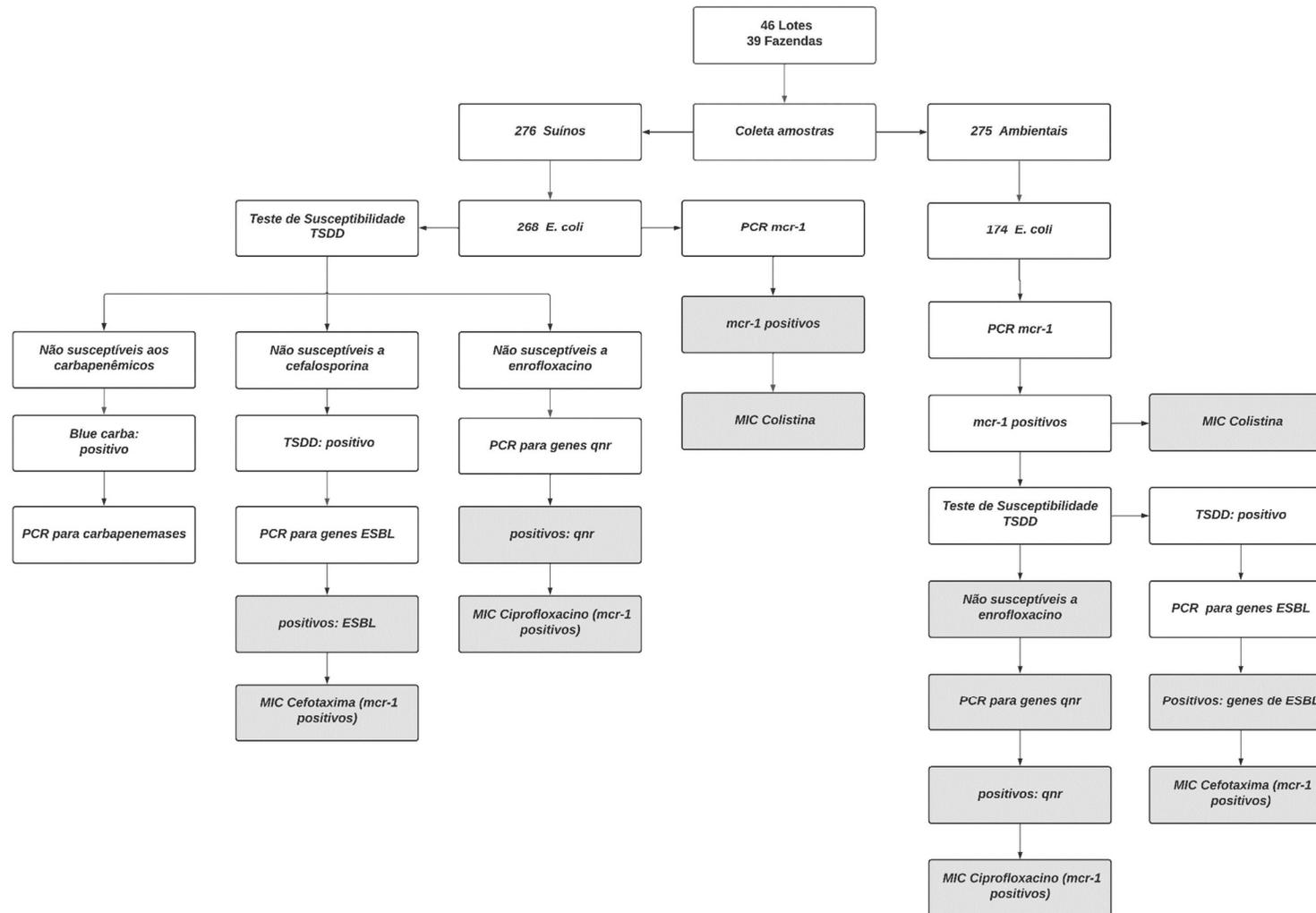
Coletaram-se, também, amostras ambientais (46 amostras de água, 92 amostras de piso da pocilga, 92 amostras de *swab* dos bebedouros dos suínos e 45 amostras de esterqueiras) com base no método de amostragem de conveniência para avaliar a disseminação genética de *mcr-1* nas fazendas. As coletas foram realizadas em todas as granjas, exceto a coleta de uma esterqueira devido à dificuldade de acesso ao local. Para melhor compreensão do desenho do estudo, a Figura 2 apresenta o fluxograma de análise das amostras.

As amostras foram utilizadas para as seguintes finalidades:

- a) amostras de água destinada ao consumo dos animais: análise de resíduos de antimicrobianos e isolamento de *E. coli* e detecção de genes de resistência;
- b) piso de pocilga: isolamento de *E. coli* e detecção de genes de resistência;
- c) amostra de bebedouro dos animais: isolamento de *E. coli* e detecção de genes de resistência;
- d) amostra de esterqueira: isolamento de *E. coli* e detecção de genes de resistência;
- e) amostra de ração: detecção de resíduos de antimicrobianos;
- f) amostra de músculo: detecção de resíduos de antimicrobianos.

As coletas somente aconteceram após a assinatura do termo para uso de animais (APÊNDICE 1). As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório e processadas em um período máximo de 24h.

Figura 2. Representação esquemática do estudo realizado.



Os quadrados cinzas indicam isolados positivos para *mcr-1* com caracterização completa. Os isolados foram definidos como não suscetíveis quando relatados como intermediários (I) ou resistentes (R) a qualquer antimicrobiano (Jarlier et al., 2019). TSDD: Teste do Sinergismo do Duplo Disco. MIC: Concentração inibitória mínima; ESBL: *Extended-spectrum β-lactamases*.

Fonte: O autor.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.2.1 Amostras de suínos

Foram obtidas 276 amostras de *swab* retal de suínos, provenientes de animais sadios (um *swab* por animal) pesando aproximadamente 125-135 kg (cinco a seis meses de idade) coletadas no período de terminação. A coleta ocorreu de modo asséptico, através da introdução de *swab* no reto dos animais, onde então foram realizados movimentos circulares para obtenção da amostra. Utilizou-se um *swab* por animal e, depois da coleta, foram colocados no tubo contendo o meio de transporte *Stuart* (Absorve®). Os *swabs* foram incubados em 20mL de Caldo Triptona Caseína de Soja (TSB) (KASVI®), contendo os antimicrobianos ceftazidima em concentrações subinibitórias (1µg/mL) e ampicilina (100 µg/ml de ampicilina). Incubados por 24h, a 37°C, para posterior semeadura e identificação, conforme o item 4.3. O objetivo da adição da ceftazidima foi diminuir população de *E. coli* sensível a cefalosporina testada e a adição de ampicilina visou minimizar o crescimento de *Enterococcus* spp.

4.2.2 Coleta de amostras ambientais

4.2.2.1 *Swab* bebedouro

Foram realizadas coleta de 92 amostras dos bebedouros dos animais de 46 lotes (39 granjas). Duas baias foram amostradas aleatoriamente e dois *swabs* foram então realizados, passando-se a parte que contém algodão ao redor de toda a superfície que os animais podem ter contato ao tomar água. Na sequência, armazenaram-se em caixas isotérmicas e processados consoante descrito no item 4.2.1. Incubados por 24h, a 37°C, para posterior semeadura e identificação conforme o item 4.3.

4.2.2.2 *Swab* arraste da pocilga

A coleta das amostras deu-se em ambos os pés, bota de plástico descartável e propé. Foram selecionadas duas baias aleatoriamente em cada granja.

A seguir, circulou-se em várias direções da pocilga, cuidando para colocar em contato o propé com as fezes depositadas no piso. Após a colheita da amostra, os propés foram acondicionados em frascos estéreis contendo 40 mL de água peptonada na concentração de 0,1%, e a bota plástica descartada. Os propés foram armazenados em caixas isotérmicas para o transporte até o laboratório, onde mantiveram-se sob refrigeração para processamento no dia posterior. No total, obteve-se 92 amostras de 39 granjas (46 lotes).

As amostras foram processadas adicionando 40 mL de água peptonada tamponada 0,1% em cada frasco contendo os propés. Homogeneizadas para que se obtivesse uma solução mais líquida e uniforme de fezes. Retiraram-se 2 mL desta solução e adicionaram-se 18 mL de caldo TSB contendo ceftazidima (1µg/mL). Incubados por 24h, a 37°C, para posterior semeadura e identificação em conformidade com o item 4.3.

4.2.2.3 Esterqueiras

Foram obtidas 45 amostras, sendo uma de cada granja (totalizando 38 granjas diferentes e 45 lotes coletados). As amostras foram coletadas em frasco estéril contendo um volume de aproximadamente 80mL. Armazenaram-se em caixas isotérmicas para o transporte e, até o processamento (dia posterior a coleta), foram mantidas sob refrigeração 2-8°C. As amostras foram processadas diluindo 5mL ou 5g de amostra de esterqueira em 45mL de água peptonada tamponada (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). Na sequência, foram homogeneizadas para que se obtivesse uma solução mais líquida e homogênea. Foram retirados 2 mL desta solução e adicionados 18 mL de caldo TSB contendo ceftazidima (1µg/mL). Incubados por 24h, a 37°C, para posterior semeadura e identificação conforme o item 4.3.

4.2.2.4 Água

A coleta realizou-se em concordância com a metodologia adaptada do *Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Transmitidas por Alimentos* (Brasil, 2010). Ao chegar em cada na propriedade, localizou-se a torneira da qual poderia ser coletada a amostra, sempre levando em consideração que a

origem da água seria a mesma destinada aos animais. Primeiro, realizou-se a limpeza da torneira com esponja e detergente até conseguir remover todas as impurezas; depois, desinfecção com álcool 70. Após este procedimento, abriu-se a torneira e deixou-se a água escorrer na vazão máxima por, no mínimo, três minutos. Passado esse tempo, diminuiu-se a vazão e o frasco estéril foi aberto próximo a torneira para coletar a amostra e tampar imediatamente o frasco. Foram coletadas duas amostras de água de 100mL em cada granja, tendo em conta o ponto em que ela é disponibilizada aos animais. Elas foram acondicionadas em frascos estéreis de 100mL, um com tiosulfato 10mg (633µL de solução de tiosulfato 0,1N) e outro sem tiosulfato, totalizando 200mL para análise microbiológica. Além da coleta para análise microbiológica, 1L de água, dividido em duas garrafas estéreis de 500mL, contendo 250 microlitros de formol em cada uma, foi coletado para encaminhamento para análise de resíduos de antimicrobianos. No total, foram obtidas 92 amostras. Os frascos foram armazenados em caixas isotérmicas para transporte e as amostras foram processadas ao chegar ao Laboratório.

Foi realizada a filtração de 200mL de água do mesmo ponto de coleta, com a mesma membrana (membrana Acetato de Celulose 0,22 Ø47mm - 0.22 µm; Sartorius®), em seguida, colocou-se a membrana com a superfície virada para baixo em caldo TSB (frasco estéril com 40 mL de caldo TSB sem antimicrobiano). Incubados por 24h, a 37°C, para posterior semeadura e identificação de acordo com o item 4.3.

4.3 IDENTIFICAÇÃO *E. coli*

As amostras foram semeadas utilizando uma alça estéril de 10 microlitros em ágar *MacConckey* (HIMEDIA) e EMB (*Eosin Methylene Blue Agar* – OXOID). As placas foram incubadas por 18-24h, a 37°C, para isolamento e identificação de *E. coli*. Em caso de colônias suspeitas, estas foram encaminhadas para identificação através de espectrometria de massas utilizando o equipamento MALDI-TOF/MS. (Brucker Daltonics, Germany).

Após o crescimento em ágar, três a quatro colônias lactose positivas com características típicas de *E. coli* foram selecionadas e estocadas em duplicata em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – OXOID) com glicerol 16% em freezer -80°C para análises posteriores.

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para caracterização do perfil fenotípico de susceptibilidade aos antimicrobianos realizou-se o teste de disco difusão em ágar Mueller Hinton (OXOID). Foram utilizados antimicrobianos representativos das seguintes classes de β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos), aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclinas e inibidores da via do folato como segue: amoxicilina com ácido clavulânico (AMC, 20 μ g/10 μ g), cefepime (FEP, 30 μ g), cefotaxima (CTX, 30 μ g), ceftazidima (CAZ, 30 mg), ceftiofur (EFT, 30 μ g), enrofloxacino (ENR 5 μ g), gentamicina (GM, 10 μ g), imipenem (IPM, 10 μ g), tetraciclina (TET 30 μ g) e sulfametoxazol com trimetoprim (STX 23,75 μ g /1,25 μ g). A cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade e, depois de 18h de incubação, a 37°C, os resultados foram interpretados e os isolados classificados como "suscetíveis" (S) "intermediários" (I) e "resistentes" (R), de acordo com os CLSI-M100 Ed28 (CLSI 2021) e CLSI-VET08 Ed4. (CLSI, 2018c, 2019).

Os antimicrobianos utilizados foram selecionados com base em seu significado clínico ou epidemiológico para a saúde humana e animal.

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima para polimixinas, quinolonas e cefalosporinas

Para avaliação do perfil de susceptibilidade à colistina, aplicou-se a técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima, conforme preconizado pelos Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana do Comitê Europeu – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2018). Para isolados não susceptíveis (com sensibilidade intermediária ou resistentes) às quinolonas e cefalosporinas segundo os resultados obtidos no teste de disco difusão, sucedeu-se a determinação da CIM para cefotaxima e ciprofloxacino. Para o controle da qualidade, usou-se a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC25922. A interpretação dos resultados foi realizada utilizando o EUCAST 2018 e CLSI 2021.

4.5 PESQUISA FENOTÍPICA DE ESBL ATRAVÉS DO TESTE DE SINERGISMO DE DISCO DUPLO (TSDD)

Para pesquisa fenotípica de ESBL foi realizada a Técnica de Sinergismo de Duplo Disco (TSDD). Esse teste é baseado na aproximação de discos contendo as cefalosporinas (cefotaxima 30ug, ceftazidima 30ug, cefepima 30ug) a um disco com o ácido clavulânico (amoxicilina-ácido clavulânico 30ug/10ug - AMC). A disposição dos discos de centro a centro foi de 15mm, conforme padronizado pelo Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST). O teste foi aplicado para isolados de *E. coli* considerados não suscetíveis (resistentes ou intermediários) à ceftazidima, cefotaxima ou ceftiofur por disco difusão. O resultado positivo foi interpretado quando as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos de cefalosporinas aumentaram na direção do disco (AMC) que contém o ácido clavulânico.

4.6 PESQUISA FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES ATRAVÉS DO TESTE DE BLUECARBA

Todos os isolados de *E. coli* considerados não suscetíveis a imipenem no antibiograma foram testados para pesquisa fenotípica de carbapenemases, empregando o método do BlueCarba (Pires et al., 2013). Para isso, utilizaram-se três a quatro colônias isoladas no ágar Mueller Hinton (KASVI®) na realização do teste. Posterior à incubação, a mudança da coloração de verde para amarelo ou de azul para verde indicou resultado positivo. Uma cepa, previamente caracterizada como produtora de NDM-1, foi usada como controle positivo (Wink et al., 2021) e *E. coli* ATCC 25922 foi usada como controle negativo.

4.7 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA

4.7.1 Extração de DNA

Uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de *McFarland* foi preparada usando colônias puras. O DNA genômico foi extraído através de lise térmica em 1000

μL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7,8) por 40min: sendo aquecido por 20min a 80°C seguido pelo resfriamento a -20°C por 20min. (Lentz et al., 2017). Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm, por quatro minutos, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo e utilizado para a realização de PCR.

4.7.2 Pesquisa genotípica de ESBLs

Para detecção dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, aplicou-se o protocolo descrito por Dierikx et al. (2010), e para o gene *bla*_{CTX-M}, o protocolo de Ojdana et al. (2014). O detalhamento das reações de PCR consta na Tabela 3. Para todas as reações, foi incluído controle positivo previamente caracterizado (Lentz et al., 2017; 2019) e o isolado *E. coli* RSBR 215 sob o depósito JADOYT000000000.

4.7.3 Pesquisa de genes de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*)

Para detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, utilizou-se o protocolo descrito por Yue e colaboradores (Yue et al., 2008), realizando a técnica de PCR multiplex para realizar a detecção simultânea dos três genes na mesma reação de PCR (Tabela 3). Os controles positivos da reação utilizados foram o isolado previamente caracterizado *Escherichia coli* RSBR215 (*qnrB*+) (número de acesso GenBank: JADOYT000000000) e as cepas *Salmonella sp.* 473 (*qnrS*+), e *Enterobacter cloacae* 506 (*qnrA*+), gentilmente cedidos pelo Laboratório da Professora Silvia Dias, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). O controle negativo foi água ultrapura livre de DNase e RNase.

Tabela 3. Primers e condições de PCR utilizadas para a pesquisa dos genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP-type}, *bla*_{VIM-type}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-type}, *bla*_{GES-type}, *bla*_{OXA-48}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *fumC*, *fimH* e *mcr-1*.

Genes	Amplicon (pb)	Primers (5' - 3')	Condições de PCR utilizadas	Ciclos	Referência
<i>mcr-1</i>	259	(F ^a) CGGTCAGTCCGTTTGTTC (R ^b) CTTGGTCGGTCTGTAGGG	95°C - 5min; 95°C - 45s; 60°C - 45s; 72°C - 30s; 72°C - 3 min	35	Liu et al., 2016
<i>bla</i> _{SHV}	795	(F ^a) TTATCTCCCTGTTAGCCACC (R ^b) GATTTGCTGATTTGCTCGG	94°C - 3min; 94°C - 60s; 55°C - 60s; 72°C - 60s; 72°C - 10 min	30	Dierikx et al., 2010
<i>bla</i> _{TEM}	964	(F ^a) GCGGAACCCCTATTTG (R ^b) ACCAATGCTTAATCAGTGAG	94°C - 3 min; 94°C - 60s; 50°C - 60s; 72°C - 60s; 72°C - 10min	25	
<i>bla</i> _{CTX-M}	585	(F ^a) SCSATGTGCAGYACCAGTAA (R ^b) ACCAGAAYVAGCGGBGC	94 °C - 3min; 94°C - 30s; 55°C - 30s; 72°C - 45s; 72°C - 10min	35	Ojdana et al., 2014
<i>qnrA</i>	627	(F ^a) TCAGCAAGAGGATTTCTCA (R ^b) GGCAGCACTATTACTCCCA			
<i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	469	(F ^a) GATCGTGAAAGCCAGAAAGG (R ^b) ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	94 °C - 3 min; 94°C - 60s; 57°C - 60s; 72°C - 60s; 72°C - 10min	35	Yue et al., 2008
	417	(F ^a) ACGACATTCGTCAACTGCAA (R ^b) TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
NDM F ^a NDM R ^b	82	(F ^a) TTGGCCTTGCTGTCCCTTG (R ^b) ACACCAGTGACAATATCACCG			
IMP F ^a IMP R ^b	120	(F ^a) GAGTGGCTTAATTCTCRATC (R ^b) AACTAYCCAATAYRTAAC			
OXA-48 F ^a OXA-48 R ^b	177	(F ^a) TGTTTTTGGTGGCATCGAT (R ^b) GTAAMRATGCTTGGTTCGC	95 °C - 5 min; 95 °C - 20 s; 55 °C - 45 s; 72 °C for 30 s; e os passos da curva de desnaturação (Melt curve step) de 65 °C, com um incremento de 0,1 °C/s até 95 °C, com aquisição de fluorescência a cada 1 s.	35	Monteiro et al., 2012
VIM F ^a VIM R ^b	382	(F ^a) GTTTGGTCGCATATCGCAAC (R ^b) AATGCGCAGCACCCAGGATAG			
GES F ^a GES R ^b	594	(F ^a) CTATTACTGGCAGGGATCG (R ^b) CCTCTCAATGGTGTGGGT			
KPC F ^a KPC R ^b	785	(F ^a) TCGCTAAACTCGAACAGG (R ^b) TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC			

<i>fumC</i>	806	(F ^a) TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (R ^b) GTACGCAGCGAAAAAGATTC	95°C - 2 min; 95°C – 60s; 60°C – 60s; 72°C - 2 min; 72°C - 5 min	30	Wirth et al., 2006
<i>fimH</i>	900	(F ^a) CACTCAGGGAACCATTCAGGCA (R ^b) CTTATTGATAAACAAAAGTCAC	94°C - 5 min; 94°C - 30 s; 58°C - 90 s; 72°C – 60s; 72°C – 60s	30	Weissman et al., 2012; Roer et al., 2017

^aF: Forward primer; ^bR: Reverse primer

Fonte: O autor.

4.7.4 Pesquisa de genes de Carbapenemases pela Técnica de PCR Multiplex em Tempo Real (*Multiplex High Resolution Melting (HRM) Real Time PCR*)

A detecção da presença dos genes *bla*_{IMP type}, *bla*_{VIM type}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC type}, *bla*_{GES type}, *bla*_{OXA-48}, que codificam para as carbapenemases IMP, VIM, NDM-1, KPC, GES e OXA-48, respectivamente, deu-se através da técnica de PCR em Tempo Real, utilizando a tecnologia de curva de desnaturação de alta resolução por multiplex (*Multiplex HRM Real Time PCR*) adaptada de Monteiro et al. (2012) e previamente descrita (Lentz et al., 2017). As condições podem ser consultadas na Tabela 3. O controle negativo foi água livre de RNase e os controles positivos foram: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) A28008 (KPC+), *P. aeruginosa* 395 (IMP+), *P. aeruginosa* 81-11963A (VIM+), *K. pneumoniae* NCTC BAA2146 (NDM-1+), *P. aeruginosa* 48-8896A (GES+) e *K. pneumoniae* 68-5227A (OXA-48+), gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Escola Paulista de Medicina. Esta técnica foi executada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em parceria com o Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS).

4.7.5 Pesquisa genotípica para detecção do gene *mcr-1*

Para detecção da presença de *mcr-1*, cumpriu-se a técnica de PCR *in house*, usando os *primers* descritos por Liu e colaboradores (Liu et al., 2016). O controle positivo foi o isolado *Escherichia coli* RSB215, depósito sob o número JAD0YT000000000 no Genbank (Lentz et al., 2016). O detalhamento das reações de PCR é apresentado na Tabela 3.

4.8 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Para avaliar a disseminação de isolados *mcr-1* positivos nas granjas de suínos, um total de 16 *E. coli* portadoras do gene *mcr-1* (nove *swabs* retais e sete amostras ambientais; de nove granjas), foram selecionadas e submetidas ao sequenciamento do genoma completo usando a plataforma Illumina MiSeq™ (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos), após extração de DNA usando QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha). Efetuou-se a quantificação do DNA com o kit

Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, de acordo com as recomendações do fabricante (ThermoFisher, MA, Estados Unidos). A biblioteca Paired-end, construída com o Kit de Preparação de Biblioteca de DNA Nextera™ XT (MiSeq™ System), e a execução realizada com o kit MiSeq™ Reagent V2 (500 ciclos), com cobertura de 100x. Montaram-se os dados brutos usando CLC *Genomic Workbench* 20.0.4 (<https://digitalinsights.qiagen.com>) e os *contigs* foram anotados com PROKKA (*Galaxy Version* 1.13) (Seemann, 2014). A análise dos *contigs* ocorreu pelo ResFinder v3.2 (Zankari et al., 2012), PlasmidFinder v2.0, *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (Alcock et al., 2020) e *Antibiotic Resistance Genes Online* (ARGO) (Scaria et al., 2005). Os Tipos de Sequência (STs) foram caracterizados por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) v2.0 (Larsen et al., 2012). Depositaram-se os dados de sequência no GenBank sob os números de acesso individuais. O arquivo .fasta dos *contigs* foi submetido na *Web Tool CHTyper* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/chtyper/>) para determinação das CHs.

4.9 ANÁLISE DE ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO LC-MS/MS

As análises efetivaram-se por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com diferentes abordagens: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem (LC-MS/MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas híbrida quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF). O equipamento utilizado para esta finalidade foi um cromatógrafo líquido da Série 1100 (*Agilent Technologies*) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 (*Applied Biosystems*) usando uma sonda de eletropulverização (ESI) em modo positivo como fonte de ionização (LC-MS/MS), conforme relatado anteriormente (Jank et al., 2014; Jank et al., 2018). A LC-MS/MS – *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method* – é uma técnica de análise de compostos orgânicos, extremamente sensível e seletiva, portanto, adequada para a análise de antimicrobianos nas amostras de alimentos provenientes dos animais, bem como das amostras provenientes de seu ambiente de produção objetos deste estudo. As análises foram realizadas pelo Laboratório Nacional Agropecuário, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, utilizando

metodologia já desenvolvida e validada, aplicada em amostras oficiais. O método foi aplicado à detecção de 48 antimicrobianos, conforme segue na Tabela 4:

Tabela 4. Antimicrobianos avaliados por LC/MS-MS

Classe	Antimicrobianos
Sulfonamidas	sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfadoxina, sulfadimetoxina, sulfaclopiridazina, sulfaquinoxalina, sulfizoxazol
Tetraciclinas	tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxicilina
Quinolonas	ciprofloxacino, enrofloxacino, difloxacino, sarafloxacino, danofloxacino, norfloxacino ácido nalidíxico, ácido oxolínico, flumequina
β -lactâmicos	penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e nafcilina (penicilinas); ceftiofur, cefapirina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, nafcilina, cefquinoma, cefalônio, cefalexina (cefalosporinas)
Macrolídeos e Lincosamidas	lincomicina (lincosamida); eritromicina, espiramicina, tilmicosina, azitromicina, tilosina, clindamicina (macrolídeos)
Outros	trimetoprim e bromexina

Fonte: O autor.

Para a análise das amostras de músculo, uma alíquota de 2,0 g foi pesada e submetida ao preparo a fim de eliminar possíveis interferentes que possam prejudicar a análise, utilizando 100 mg de C18-bulk, purificação à baixa temperatura (-18°C durante 40 minutos). O sobrenadante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 45°C, até atingir um volume de cerca de 300 μ L. A amostra foi, então, avolumada a 1,0 mL com água ultrapura, e uma alíquota de 10 μ L do extrato final foi submetida à análise por LC-MS/MS. A separação cromatográfica ocorreu utilizando uma coluna Agela Durashel RP (2,1 \times 100 mm, 3 μ m, 100 Å), e a fase móvel foi composta por (A) água com 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. Controles de qualidade foram analisados conjuntamente com as amostras, contendo todas as substâncias de interesse em diferentes concentrações, a fim de determinar a concentração das mesmas. Os dados foram processados através do *software Analyst 1.6*.

Já as amostras ambientais foram analisadas de acordo com metodologia modificada de Jank et al. (2014), utilizando preparo de amostra e concentração com extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Processou-se uma alíquota de 100 mL de amostra líquida ou 100 g de amostra sólida utilizando SPE, previamente condicionado com 6 mL de acetona 0,3% de ácido acético, 6 mL de

metanol com 0,3% de ácido acético e 3 mL de água:metanol (70:30). A amostra foi carregada e, posteriormente, eluída com 12 mL de acetona 0,3% de ácido acético e 12 mL de metanol com 0,3% de ácido acético, evaporada à secura com fluxo de nitrogênio a 45°C e retomada em água:acetonitrila (98:2) com 0,1% de ácido fórmico. Injetou-se uma alíquota de 10 µL no sistema LC-MS/MS. A separação cromatográfica ocorreu com o uso uma coluna Agela Durashel RP (2,1 × 100 mm, 3 µm, 100 Å), e a fase móvel foi composta por (A) água com 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. Controles de qualidade foram analisados conjuntamente com as amostras, contendo todas as substâncias de interesse em diferentes concentrações, visando determinar a concentração das mesmas. O *software Analyst* 1.6 processou os dados. O método detectou concentrações acima de 400 ng L⁻¹ para os 48 antimicrobianos das oito classes diferentes.

4.10 COLETA DE DADOS

As informações pertinentes aos animais utilizados neste projeto foram consultadas nos Boletins Sanitários de cada um dos lotes e também nas fichas de acompanhamento dos lotes fornecidos pelos produtores.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi montado com auxílio do *Microsoft Excel*® (*Microsoft Inc., Redmond, Washington, Estados Unidos*). E, as análises estatísticas foram realizadas em R, usando o RStudio (*R Core Team, 2019*).

Nessa perspectiva, a associação entre exposição antimicrobiana com resíduo antimicrobiano nas amostras de carne suína, perfil fenotípico de resistência e genes de resistência antimicrobiana foram avaliadas pelo teste exato de Fisher e adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Nesta investigação, foram respeitados os preceitos legais da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRGS, conforme o disposto na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 estabelecidos para pesquisa com animais. O Projeto de nº 33494 foi submetido e aprovado junto à CEUA-UFRGS (ANEXOS 1 e 2) e também submetido e aprovado no CEP GPPG/HCPA sob número de 2018-0672 (ANEXOS 3 e 4).

7 ARTIGOS CIENTÍFICOS

7.1 ARTIGO 1: *MCR-1* GENE IN LATIN AMERICA: HOW IS IT DISSEMINATED AMONG HUMANS, ANIMALS, AND THE ENVIRONMENT?

Artigo 1: *mcr-1* Gene in Latin America: How Is It Disseminated Among Humans, Animals, and the Environment?

Artigo publicado na Revista Frontiers “Challenges and Successes of One Health in the Context of Planetary Health in Latin America and the Caribbean”.

O mesmo encontra-se integralmente disponível ao final desta Tese no Apêndice 2.

8 DISCUSSÃO GERAL

A resistência antimicrobiana é uma grande ameaça à saúde humana (WHO, 2022) e um dos desafios de saúde mais importantes no século 21 (CDC, 2019; FDA, 2019). A produção animal tem sido caracterizada pela ampla utilização de antimicrobianos e o uso excessivo contribui para a RAM. Apesar dos dados disponíveis de aumento da utilização de antimicrobianos na produção animal, é complexo determinar o impacto da sua utilização à saúde humana. (Singer et al., 2006; Pollock et al., 2020; Tiseo et al., 2020).

Nesse trabalho, foram analisadas características fenotípicas e genotípicas de resistência bacteriana em isolados comensais de *E. coli* de granjas de suínos no Sul do Brasil, ademais de apresentar dados relacionados à exposição dos animais aos antimicrobianos. À vista disso, observou-se um elevado percentual de *E. coli* comensal multirresistente, semelhante ao relatado por outros estudos brasileiros e também em países como África do Sul, Portugal e China. (Spindola et al., 2018; Amador et al., 2019; Abdalla et al., 2021; Hu et al., 2021; Pissetti et al., 2021).

A resistência aos carbapenêmicos não foi relatada, semelhante ao publicado por diversos ensaios realizados em ambientes de produção animal, uma vez que a utilização desta classe terapêutica não é comum nos animais de produção. (Franco et al., 2015; Lentz et al., 2016; Mendonça et al., 2016; Amador et al., 2019).

Quanto ao perfil genotípico encontrado nos suínos, um número expressivo de animais apresentou os genes *mcr-1*, *bla*_{CTX-M}, *qnrB* e *qnrS*, conferindo resistência a antimicrobianos criticamente importantes usados em medicina humana, além de terem sido encontrados amplamente distribuídos no ambiente da granja. As porcentagens de resistência descobertas foram muito semelhantes em amostras de suínos e ambientes, sugerindo que eles estão totalmente integrados.

Outrossim, 70% dos isolados positivos para o gene *mcr-1* deste estudo eram coprodutores de, pelo menos, um dos genes de resistência a cefalosporinas e/ou quinolonas. As descobertas sugerem que as fazendas podem ser uma fonte de disseminação de muitos genes de resistência antimicrobiana, incluindo *mcr-1*. No presente estudo, a ocorrência do gene *mcr-1* (25%) foi consideravelmente maior do que as relatadas anteriormente no Brasil e na América Latina (Fernandes et al., 2016;

Lentz, 2021; Girardello et al., 2021). Por outro lado, a China relatou níveis críticos de prevalência de *mcr-1*.

O estudo de Tong et al., em 2018, realizou-se envolvendo a análise em 18 províncias da China que têm um grande uso de colistina, detectando *mcr-1* em uma taxa extremamente alta de 76,2% (Tong et al., 2018). Zhang et al. também chegaram a níveis de ocorrência de *mcr-1* significativamente mais altos, com 79,2% em fazendas de suínos (Zhang et al., 2018). Os dados desta tese também revelaram uma grande utilização de colistina, com a detecção do gene *mcr-1* nos animais e no ambiente da fazenda.

Assim como previamente reportado por Liu e Li e colaboradores, esse estudo constatou um elevado número de isolados *mcr-1* positivos nos suínos, demonstrando que as cepas *mcr-1* positivas são mais prevalentes em fazendas do que na comunidade ou em hospitais (Liu et al., 2016; Li et al., 2019). Apesar disso, as fazendas estão intimamente ligadas à vida humana, e as bactérias transmitidas por alimentos podem infectar humanos através da cadeia alimentar. Além disso, as cepas multirresistentes (MDR) podem se espalhar contaminando alimentos; ou através dos resíduos animais que podem contaminar culturas com vegetais. (Liu et al., 2019; Xia Xiaomin et al., 2020).

Essa alta ocorrência de resistência nas granjas de suínos pode estar associada ao elevado número de antibióticos utilizados. Vários mecanismos podem estar envolvidos no surgimento de cepas MDR de *E. coli*, como: 1) mecanismos de resistência comuns que ocorrem com antimicrobianos da mesma categoria, como mutações na proteína ligante de penicilina e presença de β -lactamases. Isso também pode ocorrer com antibióticos de diferentes classes devido à presença de bombas de efluxo atuando em diferentes antibióticos; 2) exposição a múltiplos antibióticos através do uso rotineiro de terapia combinada e falha repetida do tratamento; e 3) presença de plasmídeos portadores de genes de resistência a múltiplos antibióticos. Em particular, a resistência à colistina, cefalosporinas e quinolonas, antimicrobianos criticamente importantes usados em humanos, representam um alto risco, em razão da perda da eficácia antimicrobiana pode comprometer os tratamentos clínicos utilizados para infecções graves em humanos. (Tarakdjian et al., 2020).

No presente estudo, 16 isolados *mcr-1* positivos foram selecionados e avaliados através do sequenciamento completo do genoma. Observou-se que a

disseminação do gene *mcr-1*, no Sul do Brasil, está relacionada ao grupo de incompatibilidade plasmidial IncX4. Este resultado corrobora com estudos já realizados no país, que relatam disseminação do *mcr-1* ligada a este plasmídeo. (Dalmolin et al., 2017; Aires et al., 2017, Sellera et al., 2017, Lentz et al., 2021).

A maioria dos isolados avaliados nessa investigação pertence ao CC10, um complexo clonal clinicamente importante internacionalmente. Da mesma maneira, ST10 e ST617 (CC10) já foram descritos em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, animais, plantas, águas residuais e córregos urbanos. (Manges et al., 2015; Varela et al., 2015; Reid et al., 2019; Massella et al., 2020).

Dados disponíveis na Enterobase (<http://enterobase.warnick.ac.uk/>) constataram vasta distribuição mundial do clone ST617, tendo sido identificado em diferentes fontes: humanas, animais e ambientais em pelo menos 31 países. Eles foram detectados principalmente em países europeus, Estados Unidos e China. Até o momento, apenas quatro isolados de *E. coli* ST617 foram relatados no Brasil. Pesquisas realizadas na China e na Coreia descobriram que esse tipo de ST também está relacionada à co-seleção de bla_{NDM}, fato que preocupa. (Nguyen et al., 2019; Peng et al., 2021).

É importante notar que, no presente trabalho, as ST617, ST101, ST48 e ST 156 foram identificadas em suínos e isolados ambientais nas mesmas fazendas, sugerindo que se disseminaram no ambiente da fazenda. (Wang J et al., 2018; Dhaouadi et al., 2020; Nakano et al., 2021).

No entanto diferentes STs carregando o gene *mcr-1* foram verificados, tanto em suínos, quanto em amostras de ambiente no mesmo lote, indicando que a disseminação do gene *mcr-1* pode ter ocorrido através de transferência genética horizontal entre diferentes linhagens, como já descrito previamente. (El Garch et al., 2018; Shen et al., 2018; Liu BT et al., 2017; Matamoros et al., 2017).

De acordo com nossos resultados da investigação ora desenvolvida, em todos os lotes, os animais receberam doxiciclina, ciprofloxacino, tiamulina, florfenicol, neomicina, norfloxacino. Além disso, este estudo demonstrou altas taxas de resistência às cefalosporinas, quinolonas e tetraciclina. Porém não foi possível estabelecer uma associação estatisticamente significativa entre fenótipo de resistência, genótipo e exposição antimicrobiana, o que também foi relatado por Sali e colaboradores. (Sali et al., 2021).

Alguns estudos relataram que a exposição à tetraciclina, macrolídeos, cefalosporina e quinolonas está associada a altos níveis de resistência fenotípica. No entanto, altos níveis de resistência fenotípica (Langlois et al., 1988; Dunlop et al., 1998; Akwar et al., 2008; Vieira et al., 2009) e genotípica (Barkovskii et al., 2012; Holman et al., 2013; Agga et al., 2014) à tetraciclina também foi encontrada em suínos que não foram expostos à tetraciclina. Essa correlação contraditória entre exposição antimicrobiana e fenótipo de resistência também foi demonstrada para macrolídeos (Holman et al., 2013; Kalmokof et al. 2011; Loof et al., 2014).

O uso de cefalosporinas e quinolonas em suínos também foi relatado em vários países europeus por Lekagul e colegas (Lekagul et al., 2019). Os autores esclareceram a ligação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração com o nível de resistência a esses antibióticos em isolados comensais de *E. coli* de suínos (Chantziaras et al., 2014; Fournier et al., 2020). Tal qual Lekagul et al., os dados do presente trabalho revelaram a exposição dos animais a cefalosporinas e quinolonas, e ainda a presença de elevadas taxas de resistência, todavia, não foi possível estabelecer uma associação entre as variáveis.

No Brasil, dados oficiais de antimicrobianos utilizados na produção animal não estão disponíveis publicamente. Um relatório divulgado pelo Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2021) é a única fonte pública de dados disponível que possui informações sobre o volume total de vendas das indústrias de produtos para saúde animal que faturaram R\$ 7.586 bilhões, em 2020. Desse valor, os antimicrobianos responderam por 14% e representaram o terceiro item de maior custo na produção, além de outros como antiparasitários, aditivos, suplementos, imunobiológicos etc. Esse total inclui a venda de antibióticos, tanto para produção animal, quanto para pequenos animais. (Cardoso, 2019; SINDAN, 2021).

O uso de colistina na alimentação animal foi proibido pelo governo brasileiro em novembro de 2016. Na ausência de pressão seletiva de colistina, a taxa de detecção do gene *mcr-1* pode reduzir gradualmente, embora os plasmídeos portadores do gene *mcr-1* também carreguem, frequentemente, os genes ESBL, como o gene *bla*_{CTX-M} (Faccone et al., 2019). Entretanto, a pesquisadora dessa investigação, não encontrou, em nenhum dos plasmídeos IncX4 portadores do gene *mcr-1*, genes de resistência de ESBL.

Um estudo recente, na China, mostrou que a prevalência do gene *mcr-1* na maioria das fontes, incluindo fazendas de suínos, alimentos e amostras ambientais, diminuiu significativamente quando o uso de colistina na alimentação animal foi proibido (Wang et al., 2020). As coletas do presente estudo realizaram-se num período em que a colistina ainda estava autorizada para utilização, tendo sido prescrita através da ração, aos animais, durante 80 dias do seu período produtivo (Brasil, 2016). Nesse ínterim, a colistina é um antimicrobiano cuja técnica ainda não foi implementada pelo MAPA para detecção em alimentos, água e carnes. Esta situação limitou o diagnóstico e, por conseguinte, a monitorização dos principais antimicrobianos utilizados na medicina humana para combater a resistência em microrganismos multirresistentes.

Apesar dos resultados encontrados de detecção de resíduos de antimicrobianos nas amostras de carne, as concentrações encontradas estavam em harmonia com os parâmetros exigidos pela legislação brasileira (Brasil, 2017). Estes resultados estão em concordância com as publicações disponibilizadas pelo MAPA, que encontrou poucas não conformidades sob o ponto de vista de resíduos detectados na carne dos animais em seus últimos relatórios (PNCRC 2017, disponível em ResultadosPNCRC2017Detalhado.pdf (www.gov.br)). Apesar disso, as análises desta tese apresentaram resultados de detecção de resíduos de antimicrobianos na água, ração e carne suína que não foram relatados pelos produtores.

O Brasil possui o *Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal* – PNCRC/MAPA, objetivando promover a segurança química dos alimentos. Igualmente, 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) baseia-se nas recomendações feitas pelo *Codex Alimentarius* (BRASIL, 1999). Necessário frisar que leva em consideração o desaparecimento do resíduo, mas não abrange a seleção de cepas bacterianas resistentes.

Contudo, o MAPA publicou, em 2018, o seu *Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única* (PAN-BR), em convergência com os objetivos definidos pela Aliança Tripartite formada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), retratados no *Plano de Ação Global sobre Resistência aos*

Antimicrobianos, ao qual o Brasil é signatário. Alinhado aos esforços de combate a resistência no âmbito do *One health*, o Brasil conta, agora, também, com o *Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, no Âmbito da Agropecuária*, o PAN-BR AGRO, que possui ações específicas a serem desenvolvidas pelo setor agropecuário, referentes ao tema da RAM.

Na abordagem *One Health*, os animais têm sido considerados um importante reservatório de bactérias multirresistentes e genes de resistência a antibióticos. Embora exista a implementação de medidas de intervenção para prevenir a propagação da resistência aos antibióticos no Brasil, esta questão ainda é um problema crescente em todo o mundo. A proibição do uso de um ou dois antimicrobianos não pode ser isolada, as boas práticas na produção animal devem ser revistas.

Alternativas têm sido demonstradas para a redução na utilização dos antimicrobianos. Um estudo realizado na Embrapa Suínos e Aves utilizando o princípio de baixa densidade, criação em família e uso de boas práticas de produção determinou ser possível a criação de suínos sem uso coletivo de ATM com bons resultados produtivos e sanitários. (Wilbert et al., 2019).

Este sistema de produção de suínos em família é baseado na produção sem mistura das leitegadas (a família é mantida junta) do nascimento ao abate, na boa higiene das instalações, com densidade adequada, em práticas que privilegiam o bem-estar animal e com nutrição adequada para favorecer a saúde dos animais. Entretanto, é direcionado para sistemas de produção de pequena escala. Mas os conceitos propostos e validados nele servem como subsídios aos médios e grandes sistemas de produção e no uso prudente de ATMs para buscar melhor posicionamento no novo padrão concorrencial.

A partir do conhecimento da pesquisadora, este é o primeiro estudo a detectar resíduos de antimicrobianos em sistemas de produção de suínos brasileiros, da granja ao abatedouro. A associação com exposição antimicrobiana e os determinantes de resistência é muito complexa e necessita ser aprofundada. Como o Brasil é produtor e exportador mundial de suínos, pesquisas como essa devem ser largamente realizadas e constantemente aprimoradas. A *E. coli* comensal apresentou altas taxas de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções humanas críticas. O monitoramento de cepas de *E. coli* resistentes à colistina é

essencial para entender a prevalência de genes de resistência à colistina na medicina humana e veterinária, incluindo a produção de suínos. A presença de múltiplos genes de resistência, em especial *mcr-1*, reforça a importância de manter programas de vigilância de resistência antimicrobiana em sistemas de produção de alimentos e promover o uso prudente de antibióticos na pecuária.

Por fim, enfatiza-se que uma maior vigilância do uso de antimicrobianos e resistência bacteriana é basilar para diminuir o impacto do uso excessivo e não regulamentado de antimicrobianos em animais de produção. Portanto, o monitoramento de antimicrobianos veterinários é essencial para conter o aumento da RAM e rastrear os esforços de administração antimicrobiana em humanos e animais.

9 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- Isolados de *E. coli* provenientes de suínos e do ambiente da fazenda apresentaram os genes *mcr-1*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrB* e *qnrS*. Entretanto, não se detectou nenhum isolado portador dos genes de resistência aos carbapenêmicos investigados no estudo;
- Foram encontrados Isolados produtores do gene *mcr-1* com significativo perfil de multirresistência, incluindo a produção de genes de resistência a importantes antimicrobianos como *bla*_{CTX-M} e *qnrB* e *qnrS*;
- Entre os isolados *mcr-1* positivos observou-se a presença de clones internacionalmente relevantes, como os do complexo clonal 10 (CC10);
- A disseminação de *mcr-1* caracterizou-se pela presença do plasmídeo do tipo IncX4 em todos os isolados sequenciados;
- Os animais foram expostos a diversas classes de antimicrobianas durante o período de terminação;
- Houve a detecção de resíduos de antimicrobianos nas amostras avaliadas que não haviam sido reportados pelos produtores;
- Não foi possível estabelecer uma relação estatisticamente significativa entre a utilização de antimicrobianos pelos animais e o perfil fenotípico de resistência, bem como para os genes de resistência;
- São necessários mais estudos para estabelecer uma relação entre a exposição aos antimicrobianos e o perfil de resistência dos isolados obtidos no ambiente da fazenda.

REFERÊNCIAS TESE

- Abayneh M, Tesfaw G, Abdissa A. 2018. Isolation of Extended-Spectrum β -lactamase-(ESBL-) Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Patients with Community-Onset Urinary Tract Infections in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018(13):4846159. doi: 10.1155/2018/4846159.
- ABCS – Associação Brasileira de Criadores de Suínos. 2018. Mapeamento da Suinocultura Brasileira. Brasília. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/attachments/http://www.abcs.org.br/attachments/01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- Abdalla SE, Abia ALK, Amoako DG, Perrett K, Bester LA, Essack SY. 2021. From Farm-to-Fork: *E. Coli* from an Intensive Pig Production System in South Africa Shows High Resistance to Critically Important Antibiotics for Human and Animal Use. *Antibiotics (Basel)*. 10(2):178. doi: 10.3390/antibiotics10020178.
- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2021. Relatório Anual 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2022.
- Abraham S, Gordon DM, Chin J, Brouwers HJ, Njuguna P, Groves MD, Zhang R, Chapman TA. 2012. Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol*. 78:6799-803.
- AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, Randall LP, Lemma F, Crook DW, Teale C, Smith RP, Anjum MF. 2017. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:2745–2749. doi: 10.1093/jac/dkx286.
- Adenipekun EO, Jackson CR, Oluwadun A, Iwalokun BA, Frye JG, Barrett JB, Hiott LM, Woodley TA. 2015. Prevalence and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Food Animals in Lagos, Nigeria. *Microb Drug Resist*. 21(3):358-65. doi: 10.1089/mdr.2014.0222.
- Adler A, Katz DE, Marchaim D. 2016. The Continuing Plague of Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 30(2):347-375. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.003.
- Agga GE, Scott HM, Amachawadi RG, Nagaraja TG, Vinasco J, Bai J, Norby B, Renter DG, Dritz SS, Nelssen JL, Tokach MD. 2014. Effects of chlortetracycline and copper supplementation on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from weaned pigs. *Prev. Vet. Med*. 114:231-46. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.010>.

- Agius P, Kreiswirth B, Naidich S, Bennett K. 2007. Typing *Staphylococcus aureus* using the spa gene and novel distance measures. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 4(4):693-704. doi: 10.1109/tcbb.2007.1053.
- Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. 2017. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7):e00317-17. doi: 10.1128/AAC.00317-17.
- Akwar HT, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith RJ, Dyck M, Waddington J, Shang D, McEwen SA. 2008. Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. *Can. J. Vet. Res.* 72:195-201.
- Al Bayssari C, Olaitan AO, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:745-6. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03552-14>.
- Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, Ortega C, Torres C. 2016. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microb Ecol.* 72:861–9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0>.
- Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. 2020. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 48(D1):D517-D525. doi: 10.1093/nar/gkz935.
- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 53:1565-1574. doi: 10.1021/bi5000564.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128(6):1037-50.
- Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J. 2009. Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 3(2):243-51. doi: 10.1038/ismej.2008.86.
- Allen HK. 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Curr. Opin. Microbiol.* 19:25-9.
- Alonso CA, Michael GB, Li J, Somalo S, Simón C, Wang Y, Kaspar H, Kadlec K, Torres C, Schwarz S. 2017b. Analysis of blaSHV-12-carrying *Escherichia coli* clones and

- plasmids from human, animal and food sources. *J Antimicrob Chemother.* 72:1589-96. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx024>.
- Alonso CA, Zarazaga M, Ben Sallem R, Jouini A, Ben Slama K, Torres C. 2017a. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Lett Appl Microbiol.* 64(5):318-34.
- Amador P, Fernandes R, Prudêncio C, Duarte I. 2019 Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics (Basel).* 8(1):23. doi: 10.3390/antibiotics8010023.
- Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* 11:2970-88. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
- Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. 2020. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms.* 8(11):1716. doi: 10.3390/microorganisms8111716.
- Antão EM, Glodde S, Li G, Sharifi R, Homeier T, Laturnus C, Diehl I, Bethe A, Philipp HC, Preisinger R, Wieler LH, Ewers C. 2008. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microb Pathog.* 45:361-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2008.08.005>.
- Anyanwu MU, Jaja IF, Nwobi OC. 2020. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 17:1028. doi: 10.3390/ijerph17031028.
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, Baloch Z. 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 11:1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
- Au A, Lee H, Ye T, Dave U, Rahman A. 2021. Bacteriophages: Combating Antimicrobial Resistance in Food-Borne Bacteria Prevalent in Agriculture. *Microorganisms.* 10(1): 46. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010046>.
- Azimi L, Talebi M, Khodaei F, Najafi M, Lari AR. 2016. Comparação da análise de repetição em tandem de número variável de múltiplos locus com a tipagem de eletroforese em gel de campo pulsado de carbapenemases produtoras de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes queimados. *Queimaduras.* 42(2):441-5. doi: 10.1016/j.burns.2015.08.024.
- Barcellos DESN, Marques BMFPP, Mores TJ, Coelho CF, Borowsk SM. 2009. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae.* 37(Supl 1):s151-s155.
- Barkovskii AL, Bridges C. 2012. Persistence and profiles of tetracycline resistance genes in swine farms and impact of operational practices on their occurrence in farms' vicinities. *Water. Air. Soil Pollut.* 223:49-62.

- Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. 2014. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(9):5428-34.
- Barton MD. 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr. Opin. Microbiol.* 19:9-15. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.017.
- Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 4(7). 10.1099/mgen.0.000192.
- Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. 2014. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* 14:13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-13>.
- Ben Said L, Jouini A, Alonso CA, Klibi N, Dziri R, Boudabous A, Ben Slama K, Torres C. 2016. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. *Sci Total Environ.* 550:1103-1109. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.042.
- Ben Yahia H, Chairat S, Gharsa H, Alonso CA, Ben Sallem R, Porres-Osante N, Hamdi N, Torres C, Ben Slama K. 2020. First Report of KPC-2 and KPC-3-Producing Enterobacteriaceae in Wild Birds in Africa. *Microb Ecol.* 79(1):30-37. doi: 10.1007/s00248-019-01375-x.
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H, Sørum H, Norström M, Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand V, Baquero F, Martinez JL. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol.* 13(5):310-7.
- Bergšpica I, Kaprou G, Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A. 2020. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics (Basel).* 9(10):678. doi: 10.3390/antibiotics9100678.
- Biran D, Ron EZ. 2018. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 416:149-161. doi: 10.1007/82_2018_108.
- Börjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S. 2013. Spread of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying bla(CTX-M-1). *Acta Vet Scand.* 55:3. <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-55-3>.
- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella*

enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother. 72(12):3317-3324. doi: 10.1093/jac/dkx327.

Bouchakour M, Zerouali K, Gros Claude JD, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, Timinouni M. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries. 4(12):779-803. doi: 10.3855/jidc.796.

Bouillon J, Snead E, Caswell J, Feng C, Hélie P, Lemetayer J. 2018. Pyelonephritis in dogs: retrospective study of 47 histologically diagnosed cases (2005–2015). J Vet Intern. Med 32:249-59. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.14836>.

Brar RK, Patil RK, Patil HC. 2020. Fluoroquinolone antibiotics: An overview. Adesh University Journal of Medical Sciences & Research. 2(1): 26-30.

Brasil. 2010. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com afinidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, na forma desta Instrução Normativa.

Brasil. Instrução Normativa SAC/MAPA 44/2015. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/Listaaditivos17.03.2020.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2020.

Brasil. Instrução Normativa SDA nº 1, de 13 janeiro de 2020. Proíbe, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana.

Brasil. Nota Técnica nº 01/2013 ANVISA. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes.

Braz VS, Melchior K, Moreira CG. 2020. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:548492. doi: 10.3389/fcimb.2020.548492.

Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Ron E, Hacker J, Dobrindt U. 2009. Adaptation of Pathogenic *E. coli* to Various Niches: Genome Flexibility is the Key. Genome Dyn. 6: 110-125. doi: 10.1159/000235766.

Burow E, Rostalski A, Harlizius J, Gangl A, Simoneit C, Grobbel M, Kollas C, Tenhagen BA, Käsbohrer A. 2019. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from

- birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev Vet Med.* 165:52-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.008.
- Burow E, Simoneit C, Tenhagen BA, Käsbohrer A. 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – a systematic review. *Prev Vet Med.* 113(4):364-75. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.12.007.
- Bush K, Bradford PA. 2016. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview, p 23-44. *In:* Silver LL, Bush K (Ed). *Antibiotics and antibiotic resistance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):969-76.
- Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, Haesebrouck F, Butaye P, Catry B, Dewulf J. 2012. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med.* 106(1):53-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.03.001.
- Campos J, Cristino L, Peixe L, Antunes P. 2016. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and *S. Rissen* clones in Portugal, 2011 to 2015. *Euro Surveill.* 21(26). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30270.
- Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22(31):30589. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.
- Cardoso, M. 2019. "Antimicrobial use, resistance and economic benefits and costs to livestock producers in Brazil". OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, 135. Paris: OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/27137b1e-en>.
- Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. 2019. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio.* 10(3):e00853-19. doi: 10.1128/mBio.00853-19.
- Caselli E, D'Accolti M, Soffritti I, Piffanelli M, Mazzacane S. 2018. Spread of *mcr-1*-driven colistin resistance on hospital surfaces, Italy. *Emerg Infect Dis.* 24:1752-1753. doi: 10.3201/eid2409.171386.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2019. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. Atlanta: Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 69(3):827-34.

- Chauvin C, Beloeil PA, Orand JP, Sanders P, Madec F. 2002. A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France. *Preventive Veterinary Medicine*. 55(2):109-120. doi: 10.1016/S0167-5877(02)00091-0.
- Chen Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang Z, Lei L, Xia Z. 2019. Increasing Prevalence of ESBL-Producing Multidrug Resistance *Escherichia coli* From Diseased Pets in Beijing, China From 2012 to 2017. *Front Microbiol*. 10:2852. doi: 10.3389/fmicb.2019.02852.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 66(10):4555-8. doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. 2019. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*. 21(8):3107-3117. doi: 10.1111/1462-2920.14713.
- Coates AR, Halls G, Hu Y. 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol*. 163(1):184-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x.
- Codjoe FS, Donkor ES. 2017. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 6(1):1. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 26: 822-80.
- Cui L, Lei L, Lv Y, Zhang R, Liu X, Li M, Zhang F, Wang Y. 2017. bla_{NDM-1}-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from a companion dog in China. *J Glob Antimicrob Resist*. 13:24-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.021>.
- Cunha MP, Lincopan N, Cerdeira L, Esposito F, Dropa M, Franco LS, Moreno AM, Knobl T. 2017. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 61:e02474-16. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02474-16>.
- Cuong NV, Padungtod P, Thwaites G, Carrique-Mas JJ. 2018. Antimicrobial Usage in Animal Production: A Review of the Literature with a Focus on Low- and Middle-Income Countries. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 7(3):75. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030075>.
- Cyoia PS, Koga VL, Nishio EK, Houle S, Dozois CM, de Brito KCT, de Brito BG, Nakazato G, Kobayashi RKT. 2019. Distribution of ExPEC Virulence Factors, bla_{CTX-M}, fosA3, and mcr-1 in *Escherichia coli* Isolated From Commercialized Chicken Carcasses. *Front Microbiol*. 9:3254. doi: 10.3389/fmicb.2018.03254.

- Daga AP, Koga VL, Soncini JGM, de Matos CM, Perugini MRE, Pelisson M, Kobayashi RKT, Vespero EC. 2019. *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:191. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191.
- Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. 2013. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol.* 162:793-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.015>.
- Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, de Lima-Morales D, Barth AL. 2017. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:2404-06.
- Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. 2018. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 90:132-133. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016.
- Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews.* 74(3):417-33, 2010.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 477(7365):457-61. doi: 10.1038/nature10388.
- de Jong A, Smet A, Ludwig C, Stephan B, De Graef E, Vanrobaeys M, Haesebrouck F. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011). *Vet Microbiol.* 171(3-4):298-306. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.030.
- Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadia-Patiño L, Gonzalez-Zorn B. 2016. Coexistence of *mcr-1* and *bla* NDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 60(10):6356-6358.
- Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 19(1):37-54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- Desvaux M, Dalmasso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. 2020. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 11:2065. doi: 10.3389/fmicb.2020.02065.
- Dewulf J, Catry B, Timmerman T, Opsomer G, de Kruif A, Maes D. 2007. Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Prev. Vet. Med.* 78:339-351. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.11.001>.

- Dhaouadi S, Soufi L, Hamza A, Fedida D, Zied C, Awadhi E, Mtibaa M, Hassen B, Cherif A, Torres C, Abbassi MS, Landolsi RB. 2020. Co-occurrence of *mcr-1* mediated colistin resistance and β -lactamase-encoding genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis in Tunisia. *J Glob Antimicrob Resist*. 22:538-545. doi: 10.1016/j.jgar.2020.03.017.
- Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol*. 145(3-4):273-8.
- Dierikx CM, Van Der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*. 8:e79005. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079005>.
- Dobrindt U, Chowdary MG, Krumbholz G, Hacker J. 2010. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol*. 199(3):145-54. doi: 10.1007/s00430-010-0161-2.
- Dolejska M, Masarikova M, Dobiasova H, Jamborova I, Karpiskova R, Havlicek M, Carlile N, Priddel D, Cizek A, Literak I. 2016. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother*. 71:63-70. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv306>.
- Doma AO, Popescu R, Mitulețu M, Muntean D, Dégi J, Boldea MV, Radulov I, Dumitrescu E, Muselin F, Puvača N, Cristina RT. 2020. Comparative Evaluation of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* Genes in *Enterobacteriaceae* Ciprofloxacin-Resistant Cases, in Swine Units and a Hospital from Western Romania. *Antibiotics (Basel)*. 9(10):698. doi: 10.3390/antibiotics9100698.
- Dominguez JE, Faccone D, Tijet N, Gomez S, Corso A, Fernández-Miyakawa ME, Melano RG. 2019. Characterization of *Escherichia coli* carrying *mcr-1*-plasmids recovered from food animals from Argentina. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 41.
- Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH, Clarke RC, Black WD, Friendship RM. 1998. Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med*. 34:283-305. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(97\)00095-0](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(97)00095-0)
- Durso LM, Cook KL. 2014. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Curr Opin Microbiol*. 19:37-44.
- Dzidic S, Suskovic J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*. 46(1):11-21.

- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014**. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARSNet) Stockholm: ECDC.
- ECDC/EFSA/EMA – European Centre for Disease Prevention and Control- European Food Safety Authority- European Medicines Agency. 2017. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*. 15(7).
- El Garch F, de Jong A, Bertrand X, Hocquet D, Sauget M. 2018. mcr-1-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals at slaughter in Europe. *Vet Microbiol*. 213:42-46. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.014.
- Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li X, Xie S, Rajkovic A, Feng Y, Fang W, Rankin SC, Yue M. 2019. Global burden of colistin-resistant bacteria: Mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). *Microorganisms*. 7(10):461.
- EMA/AMEG – European Medicines Agency/Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. London: European Medicines Agency.
- Emborg HD, Vigre H, Jensen VF, Vieira AR, Baggesen DL, Aarestrup FM., 2007. Tetracycline consumption and occurrence of tetracycline resistance in *Salmonella typhimurium* phage types from Danish pigs. *Microb. drug Resist*. 13:289-294. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.746>.
- Embrapa. 2022. Tendências em suinocultura. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/tendencias/suinos>>. Acesso em: 06 fev. 2022.
- Endimiani A, Rossano A, Kunz D, Overesch G, Perreten V. 2012. First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 73:31-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.004>.
- Erickson MC, Doyle MP. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 70(10):2426-49. doi: 10.4315/0362-028x-70.10.2426.
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*. 18(7):646-55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x.

- Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B, Stubbe M, Doi Y, Zong Z, Kola A, Schaufler K, Semmler T, Fruth A, Wieler LH, Guenther S. 2014. CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J Antimicrob Chemother.* 69:1224-30. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt516>.
- Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Anti microb Chemother.* 65:651-60. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq004>.
- Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcon L, Nievas VF, Corso A, 2019. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *bla*CTX-M genes isolated from swine in Argentina. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 18,:60-162. doi:10.1016/j.jgar.2019.03.011.
- Faccone D, Rapoport M, Albornoz E, Celaya F, De Mendieta J, De Belder D, Lucero C, Gomez S, Danze D, Pasteran F, Corso A; Mobilizable Colistin Resistance Group. 2020. Plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: A retrospective study, 2012-2018. *Rev Panam Salud Publica.* 44:e55. doi: 10.26633/RPSP.2020.55.
- Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Ghosh H, Gwozdzinski K, Schmiedel J, Gentil K, Bauerfeind R, Kämpfer P, Seifert H, Michael GB, Schwarz S, Pfeifer Y, Werner G, Pietsch M, Roesler U, Guerra B, Fischer J, Sharp H, Käsbohrer A, Goesmann A, Hille K, Kreienbrock L, Chakraborty T. 2016. Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. *Int J Antimicrob Agents.* 47:457-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.019>.
- FAO - Food and Agriculture Organization, WHO - World Health Organization. Code of practice to minimize and contain foodborne antimicrobial resistance CXC 61-2005. Adopted in 2005. Revised in 2021. Rome; 2021. Acesso em: 31 maio 2022 Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B61-2005%252FCXC_061e.pdf.
- FAO – Food and Agriculture Organization. 2016. Announcement No. 2428 of the Ministry of Agriculture regarding to the ban on the use of of colistin sulfate for animal growth promoters. Disponível em: <<http://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC169695/>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- FDA – Food and Drug Administration. 2014. FDA annual summary report on antimicrobials sold or distributed in 2012 for use in food-producing animals. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm416974.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

- FDA – Food and Drug Administration. 2021. Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/154820/download>>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186(5):1518-30. doi: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004.
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, de Oliveira Garcia D, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N. 2016. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 21(17):30214. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214.
- Fernandes MR, Sellera FP, Esposito F, Sabino CP, Cerdeira L, Lincopan N. 2017. Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7):e00234-17. doi: 10.1128/AAC.00234-17.
- Fernandes P, Martens E. 2017. Antibiotics in late clinical development. *Biochem Pharmacol.* 133:152-163. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.025.
- Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. 2017. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(13):2857-2876. doi: 10.1080/10408398.2015.1077192.
- Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen SA, Li X, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis.* 57(5):704-10.
- Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2012. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *J Antimicrob Chemother.* 67:1793-5. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks108>.
- Fischer J, San José M, Roschanski N, Schmoger S, Baumann B, Irrgang A, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2017. Spread and persistence of VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in three German swine farms in 2011 and 2012. *Vet Microbiol.* 200:118-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.026>.
- Fournier C, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. 2020. Occurrence of CTX-M-15- and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 55:105802. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.006.
- Franco BDGM, Landgraf M. 2005. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu.

- Freitag C, Michael GB, Kadlec K, Hassel M, Schwarz S. 2017. Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 200:151–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.010>.
- Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. 2016. The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5):416-422. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>.
- Frieri M, Kumar K, Boutin A. 2017. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
- Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D, Zinke O, Ansorge H, Vogel S, Klemm P, Wex T, Schröder C, Wieler LH, Schierack P. 2013. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Appl Environ Microbiol.* 79(19):5814-29. doi: 10.1128/AEM.01384-13.
- Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R. 2019. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J Travel Med.* 26(8):taz036. doi: 10.1093/jtm/taz036.
- Furlan JPR, Stehling EG. 2018. Detection of β -lactamase encoding genes in feces, soil and water from a Brazilian pig farm. *Environ Monit Assess.* 190(2):76. doi: 10.1007/s10661-017-6453-x.
- García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J. 2018. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents.* 52(1):104-108. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022.
- Garcia-Graells C, Berbers B, Verhaegen B, Vanneste K, Marchal K, Roosens NHC, Botteldoorn N, De Keersmaecker SCJ. 2020. First detection of a plasmid located carbapenem resistant blaVIM-1 gene in *E. coli* isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. *Int J Food Microbiol.* 324:108624. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108624.
- García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, García V, de Toro M, Flament-Simon SC, Blanco J, Mora A. 2019. Genomic Characterization of Prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5* *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Front Microbiol.* 10:2469. doi: 10.3389/fmicb.2019.02469.
- García-Meniño I, García V, Alonso MP, Blanco JE, Blanco J, Mora A. 2021. Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance. *Vet Microbiol.* 252(11):108924. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108924.

- García-Meniño I, García V, Mora A, Díaz-Jiménez D, Flament-Simon SC, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Blanco J. 2018. Swine enteric colibacillosis in Spain: Pathogenic potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. Coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*. 9(11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659>.
- Garg SK, Singh O, Juneja D, Tyagi N, Khurana AS, Qamra A, Motlekar S, Barkate H. 2017. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-negative infections: an overview of current evidence. *Crit Care Res Pract*. 2017:1-10. doi:10.1155/2017/3635609.
- Garza-Ramos U, Tamayo-Legorreta E, Arellano-Quintanilla DM, Rodriguez-Medina N, Silva-Sanchez J, Catalan-Najera J, Rocha-Martínez MK, Bravo-Díaz MA, Alpuche-Aranda C. 2018. Draft Genome Sequence of a Multidrug- and Colistin-Resistant *mcr-1*-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Swine Farm in Mexico. *Genome Announc*. 6(10):e00102-18. doi: 10.1128/genomeA.00102-18.
- Gillespie S.H. 2016. The role of moxifloxacin in tuberculosis therapy. *Eur Respir Rev*. 25(139):19-28. doi: 10.1183/16000617.0085-2015.
- Girardello R, Piroupo CM, Martins J Jr, Maffucci MH, Cury AP, Franco MRG, Malta FM, Rocha NC, Pinho JRR, Rossi F, Duarte AJDS, Setubal JC. 2021. Genomic Characterization of *mcr-1.1*-Producing *Escherichia coli* Recovered From Human Infections in São Paulo, Brazil. *Front Microbiol*. 12:663414. doi: 10.3389/fmicb.2021.663414.
- Goldstein EJ. 1996. Possible role for the new fluoroquinolones (levofloxacin, grepafloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin, sparfloxacin, and DU-6859a) in the treatment of anaerobic infections: review of current information on efficacy and safety. *Clin Infect Dis*. 23 Suppl 1:S25-30. doi: 10.1093/clinids/23.supplement_1.s25.
- Gonzalez AGM, Cerqueira AMF. 2020. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol*. 128(6):1568-1582. doi: 10.1111/jam.14500.
- Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U, Roschanski N. 2017. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *J Antimicrob Chemother*. 72(5):1289-1292. doi: 10.1093/jac/dkw585.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol*. 171:290-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.001>.
- Guessennd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou-Ndouba A, Ekaza E, Lambert T, Dosso M, Courvalin P. 2008. Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire [Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase

- producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast]. *Pathol Biol (Paris)*. 56(7-8):439-46. doi: 10.1016/j.patbio.2008.07.025.
- Guo YF, Zhang WH, Ren SQ, Yang L, Lü DH, Zeng ZL, Liu YH, Jiang HX. 2014. IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One*. 9: e96738. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096738>.
- Gutiérrez-Martín CB, del Blanco NG, Blanco M, Navas J, Rodríguez-Ferri EF. 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet Microbiol*. 115:218-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.014>.
- Hacker BR, Peacock SM, Abers GA, Holloway SD. 2003. Subduction factory 2. Are intermediate-depth earthquakes in subducting slabs linked to metamorphic dehydration reactions? *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*. 118. <https://doi.org/10.1029/2001JB001129>.
- Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec JY, Gay E. 2014. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol*. 171:321-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.023>.
- Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, Olsen SS, Mordhorst H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y. 2014. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*. 69:2650–2657. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku180>.
- Hansen KH, Bortolaia V, Nielsen CA, Nielsen JB, Schønning K, Agersø Y, Guardabassi L. 2016. Host-specific patterns of genetic diversity among IncI1- γ and IncK plasmids encoding CMY-2 β -lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry, and dogs in Denmark. *Appl Environ Microbiol*. 82:4705-14. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00495-16>.
- Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 60:145-147.
- Hardy B. 2002. The issue of antibiotic use in the livestock industry: What have we learned? *Animal Biotechnology*. 13(1):129-147, 2002.
- Harmer CJ, Hall RM. 2016. IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes. *MSphere* 1:e00038-16. doi: 10.1128/mSphere.00038-16
- Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. 2014. Movement of IS26-associated antibiotic

resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. *MBio* 5:e01801-14. doi: 10.1128/mBio.01801-14.

Harmer CJ, Pong CH, Hall RM. 2020. Structures bounded by directly-oriented members of the IS26 family are pseudo-compound transposons. *Plasmid* 111:102530. doi: 10.1016/j.plasmid.2020.102530.

He D, Zhu Y, Li R, Pan Y, Liu J, Yuan L, Hu G. 2019. Emergence of a hybrid plasmid derived from IncN1-F33:A-B- and *mcr-1*-bearing plasmids mediated by IS26. *J Antimicrob Chemother.* 74(11):3184-3189. doi: 10.1093/jac/dkz327.

He S, Hickman AB, Varani AM, Siguier P, Chandler M, Dekker JP, Dyda F. 2015. Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *MBio.* 6(3):e00762. doi: 10.1128/mBio.00762-15.

Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, Bushman FD, Artis D. 2010. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Nature.* 3(2):148-158.

Hollis A, Ahmed Z. 2014. The path of least resistance: paying for antibiotics in non-human uses. *Health Policy.* 118(2):264-70. doi: 10.1016/j.healthpol.2014.08.013.

Holman DB, Chénier MR. 2013. Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:1-13.

Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 387:176-187.

Hooper DC, Jacoby GA. 2015. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1354:12-31. doi: 10.1111/nyas.12830.

Hordijk J, Mevius DJ, Kant A, Bos ME, Graveland H, Bosman AB, Hartskeerl CM, Heederik DJ, Wagenaar JA. 2013. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother.* 68:2468-76. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt219>.

Hsueh SC, Lai CC, Huang YT, Liao CH, Chiou MT, Lin CN, Hsueh PR. 2020. Molecular Evidence for Intra- and Inter-Farm Spread of Porcine *mcr-1*-Carrying *Escherichia coli* in Taiwan. *Front Microbiol.* 11:1967. doi: 10.3389/fmicb.2020.01967.

Hu J, Meyers RM, Dong J, Panchakshari RA, Alt FW, Frock RL. 2016. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat Protoc.* 11(5):853-71. doi: 10.1038/nprot.2016.043.

- Hu Y, Cheng H. 2014. Research opportunities for antimicrobial resistance control in China's factory farming. *Environ Sci Technol.* 48(10):5364-5365.
- Hu Z, Peng Z, Zhang X, Li Z, Jia C, Li X, Lv Y, Tan C, Chen H, Wang X. 2021. Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in Pig Farms, Slaughterhouses, and Terminal Markets in Henan Province of China. *Foodborne Pathog Dis.* 18(10):733-743. doi: 10.1089/fpd.2021.0011.
- Huang SY, Dai L, Xia LN, Du XD, Qi YH, Liu HB, Wu CM, Shen JZ. 2009. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis.* 6:1203-09. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0348>.
- Hutton TA, Innes GK, Harel J, Garneau P, Cucchiara A, Schifferli DM, Rankin SC. 2018. Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. *J Vet Diagn Invest.* 30:64-70 <http://dx.doi.org/10.1177/1040638717729395>.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021. **Dados.** Brasil: IBGE. Disponível em: https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_202003caderno.pdf. Acesso em: 6 fev. 2022.
- Irrgang A, Falgenhauer L, Fischer J, Ghosh H, Guiral E, Guerra B, Schmogger S, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Hammerl JA, Käsbohrer A. 2017. CTX-M-15-Producing *E. coli* Isolates from Food Products in Germany Are Mainly Associated with an IncF-Type Plasmid and Belong to Two Predominant Clonal *E. coli* Lineages. *Front Microbiol.* 8:2318. doi: 10.3389/fmicb.2017.02318.
- Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK. 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J.* 89:167-73. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x>.
- Jacoby G. 2005. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases.* 41(Suppl 2):120-6. doi: 10.1086/428052.
- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2(5):10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.
- Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4):1178-82. doi: 10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006.
- Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol.* 123(3):570-81.

- Jank L, Hoff RB, Costa FJ, Pizzolato TM, 2014. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94:1013-1037. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2014.914184>.
- Jank L, Martins MT, Arsand JB, Ferrão MF, Hof RB, Barreto F, Pizzolato TM. 2018. An LC-ESI-MS/MS method for residues of fluoroquinolones, sulfonamides, tetracyclines and trimethoprim in feedingstuffs: validation and surveillance. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 35: 1975-1989. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1508895>.
- Jeong J, Lee JY, Kang MS, Lee HJ, Kang SI, Lee OM, Kwon YK, Kim JH. 2021. Comparative Characteristics and Zoonotic Potential of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Isolates from Chicken and Duck in South Korea. *Microorganisms*. 9(5):946. doi: 10.3390/microorganisms9050946.
- Johnson JK, Robinson GL, Zhao L, Harris AD, Stine OC, Thom, KA. 2016. Comparação de métodos de tipagem molecular para análise de *Acinetobacter baumannii* de pacientes de UTI. *Microbiologia diagnóstica e doenças infecciosas*. 86 (4):345-50. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.024>.
- Johnson JR, Russo TA. 2018. Acute Pyelonephritis in Adults. *N Engl J Med*. 378(1):48-59. doi: 10.1056/nejmcp1702758. Erratum in: *N Engl J Med*. 2018 Mar 15;378(11):1069.
- Jones-Dias D, Manageiro V, Martins AP, Ferreira E, Caniça M. 2016. New class 2 integron In2-4 among In1-positive *Escherichia coli* isolates carrying ESBL and PMA β genes from food animals in Portugal. *Foodborne Pathog Dis*. 13:36-9. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.1972>.
- Kalkreuter E, Pan G, Cepeda AJ, Shen B. 2020. Targeting Bacterial Genomes for Natural Product Discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 41(1):13-26. doi: 10.1016/j.tips.2019.11.002.
- Kalmokoff M, Waddington LM, Thomas M, Liang KL, Ma C, Topp E, Dandurand UD, Letellier A, Matias F, Brooks SP. 2011. Continuous feeding of antimicrobial growth promoters to commercial swine during the growing/finishing phase does not modify faecal community erythromycin resistance or community structure. *J. Appl. Microbiol*. 110:1414-1425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04992.x>.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. 2004. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(12):4574-81. doi: 10.1128/AAC.48.12.4574-4581.2004.
- Kanwar N, Scott HM, Norby B, Loneragan GH, Vinasco J, Cottell JL, Chalmers G, Chengappa MM, Bai J, Boerlin P. 2014. Impact of treatment strategies on

cephalosporin and tetracycline resistance gene quantities in the bovine fecal metagenome. *Sci Rep.* 4:5100. doi: 10.1038/srep05100.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-40.

Khanawapee A, Kerdsin A, Chopjitt P, Boueroy P, Hatrongjit R, Akeda Y, Tomono K, Nuanualsuwan S, Hamada S. 2020. Distribution and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Harboring mcr Genes Isolated from Slaughtered Pigs in Thailand. *Microbial Drug Resistance.* 27(7). <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0242>.

Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. 2017. Moraxella Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(6):e00129-17. doi: 10.1128/AAC.00129-17.

King DE, Malone R, Lilley SH. 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician.* 61(9):2741-8.

Kintz E, Heiss C, Black I, Donohue N, Brown N, Davies MR, Azadi P, Baker S, Kaye PM, van der Woude M. 2017. Salmonella enterica Serovar Typhi Lipopolysaccharide O-Antigen Modification Impact on Serum Resistance and Antibody Recognition. *Infect Immun.* 85(4):e01021-16. doi: 10.1128/IAI.01021-16.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 75. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3365-70. doi:10.1128/AAC.00126-09.

Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P. 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:23 <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2015.00023>.

Kong LH, Lei CW, Ma SZ, Jiang W, Liu BH, Wang YX, Guan R, Men S, Yuan QW, Cheng GY, Zhou WC, Wang HN. 2017. Various sequence types of *Escherichia coli* isolates coharboring bla_{NDM-5} and mcr-1 genes from a commercial swine farm in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e02167-16. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02167-16>.

Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS. 2010. Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil by using functional metagenomics. *Applied Environmental Microbiology.* 76(15):5321-5326.

Langlois BE, Dawson KA, Leak I, Aaron DK. 1988. Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1341-1344. doi: 10.1128/aem.54.6.1341-1344.1988.

- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 50(4):1355-61. doi: 10.1128/JCM.06094-11.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G. 2008. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 61(2):291-5. doi: 10.1093/jac/dkm448.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 13(12):1057-98. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen JA, Klugman K, Davies S. 2016. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet.* 387(10014):168-75. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00474-2.
- Lee JH, Takahashi M, Jeon JH, Kang LW, Seki M, Park KS, Hong MK, Park YS, Kim TY, Karim AM, Lee JH, Nashimoto M, Lee SH. 2019. Dual activity of PNGM-1 pinpoints the evolutionary origin of subclass B3 metallo- β -lactamases: a molecular and evolutionary study. *Emerging microbes & infections.* 8(1):1688-1700. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1692638>.
- Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. 2013. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 358:3-32. doi: 10.1007/82_2012_303.
- Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S. 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Vet Anim Sci.* 7:100058. doi:10.1016/j.vas.2019.100058.
- Lentz SAM, Lima-Morales D, Cuppertino VM, Nunes LS, Motta AS, Zavascki AP, Barth AL, Martins AF. 2016. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring mcr-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Eurosurveillance.* 21: pii=30267. <http://doi.gov/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30267>.
- Lentz SAM, Adam FC, Rivas PM, Souza SN, Cupertino VML, Boff RT, da Motta AS, Wink PL, Barth AL, Martins AF. 2019. High Levels of Resistance to Cephalosporins Associated with the Presence of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* from Broilers in Southern Brazil. *Microb Drug Resist.* 26(5):531-535. doi: 10.1089/mdr.2019.0050.
- Lentz SAM, Dalmolin TV, Barth AL, Martins AF. 2021. *mcr-1* Gene in Latin America: How Is It Disseminated Among Humans, Animals, and the Environment?. *Frontiers in Public Health,* 9:648940. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.648940>.

- Lentz SAM. 2017. **Prevalência de genes de resistência em isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Levy S. 2002. **The Antibiotic Paradox: How Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers**. Perseus Cambridge.
- Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 10(12 Suppl):S122-9. doi: 10.1038/nm1145.
- Levy SB, Miller RV (Eds). 1989. **Gene Transfer in the Environment**. New York: McGraw Hill.
- Lewis K. 2012. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature*. 485(7399): 439-440. doi: 10.1038/485439a.
- Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, Feng P, Tang YW, Kreiswirth BN, Chen L, Du H. 2016. Complete Sequences of *mcr-1*-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 60:4351-54.
- Li B, Yang Y, Ma L, Ju F, Guo F, Tiedje JM, Zhang T. 2015. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME Journal*, 9(11):2490-2502.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 6(9):589-601. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70580-1.
- Li Z, Cao Y, Yi L, Liu JH, Yang Q. 2019. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infect Dis*. 6(10):ofz368. doi: 10.1093/ofid/ofz368.
- Liao XP, Xia J, Yang L, Li L, Sun J, Liu YH, Jiang HX. 2015. Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from foodproducing animals. *Front Microbiol*. 6:1136. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01136>.
- Lin D, Xie M, Li R, Chen K, Chan EW, Chen S. 2016. IncFII conjugative plasmid-mediated transmission of bla_{NDM-1} elements among animal-borne *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 61: e02285-16. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02285-16>.
- Liu BT, Li X, Zhang Q, Shan H, Zou M, Song FJ. 2019. Colistin-Resistant *mcr*-Positive *Enterobacteriaceae* in Fresh Vegetables, an Increasing Infectious Threat in China. *Int J Antimicrob Agents*. 54(1):89-94. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.04.013.
- Liu BT, Liao XP, Yang SS, Wang XM, Li LL, Sun J, Yang YR, Fang LX, Li L, Zhao DH, Liu YH. 2012. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased

- food-producing animals. *J Med Microbiol.* 61:1591-9. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.043307-0>.
- Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. 2017. Emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the same animal. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(2):e01444-16.
- Liu X, Liu H, Li Y, Hao C. 2016. High prevalence of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from dogs in Shaanxi, China. *Front Microbiol.* 7:1843–52. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01843>.
- Liu X, Thungrat K, Boothe DM. 2016. Occurrence of OXA-48 carbapenemase and other β -lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009– 2013. *Front Microbiol.* 7:1057 <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01057>.
- Liu Y, Liu J-H. 2018. Monitoring colistin resistance in food animals, an urgent threat. *Expert review of anti-infective therapy.* 16(6):443-6, 2018. doi: 10.1080/14787210.2018.1481749.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16:161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Liu Z, Wang Y, Walsh TR, Liu D, Shen Z, Zhang R, Yin W, Yao H, Li J, Shen J. 2017. Plasmid-mediated novel blaNDM-17 gene encoding a carbapenemase with enhanced activity in a sequence type 48 *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e02233-16.
- Livermore D.M. 2012. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J. Intern. Med.* 27:128-142. doi: 10.3904/kjim.2012.27.2.128.
- Loayza-Villa F, Salinas L, Tijet N, Villavicencio F, Tamayo R, Salas S, Rivera R, Villacis J, Satan C, Ushiña L, Muñoz O, Zurita J, Melano R, Reyes J, Trueba GA. 2020. Diverse *Escherichia coli* lineages from domestic animals carrying colistin resistance gene *mcr-1* in an Ecuadorian household. *J Glob Antimicrob Resist.* 22:63-67. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.002.
- Lobanovska M, Pilla G. 2017. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine.* 90:135-145.
- Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, Walzer C. 2013. Comparison of ESBL–and AmpC producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLoS One.* 8:e84048. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084048>.

- Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(5):1691-6. doi: 10.1073/pnas.1120238109.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859):2095-128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
- Lu S, Jin D, Wu S, Yang J, Lan R, Bai X, Liu S, Meng Q, Yuan X, Zhou J, Pu J, Chen Q, Dai H, Hu Y, Xiong Y, Ye C, Xu J. 2016. Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai-Tibet plateau of China. *Emerg Microbes Infect*. 5(12):e122.
- Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. 2013. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 77(3):179-94. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.001.

- Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lü D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')*-*lb-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food producing animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:519-24. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00886-08>.
- Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z, Zhang L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosaf Heal [Internet]*. 2021;3(1):32–8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590053620301099>.
- Maamar E, Hammami S, Alonso CA, Dakhli N, Abbassi MS, Ferjani S, Hamzaoui Z, Saidani M, Torres C, Boutiba-Ben Boubaker I. 2016. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. *Int J Food Microbiol.* 231:69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.001>.
- Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. 2019. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev.* 32(3):e00135-18. doi: 10.1128/CMR.00135-18.
- Manges AR, Harel J, Masson L, Edens TJ, Portt A, Reid-Smith RJ, Zhanel GG, Kropinski AM, Boerlin P. 2015. Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. *Foodborne Pathog. Dis.* 12:302-10. <https://dx.doi.org/10.1089%2Ffpd.2014.1860>
- Maron DF, Smith TJ, Nachman KE. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health.* 9:48.
- Martínez JL. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front. Microbio.* 3:1. doi: 10.3389/fmicb.2012.00001.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 351(9105):797-9. doi: 10.1016/S0140-6736(97)07322-4.
- Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, Cacci LC, Iavarone AT, McGann P, Riley LW, Moreira BM. 2019. A novel plasmid-encoded *mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *J Antimicrob Chemother.* 75:60-64. doi: 10.1093/jac/dkz413.
- Massella E, Reid CJ, Cummins ML, Anantanawat K, Zingali T, Serraino A, Piva S, Giacometti F, Djordjevic SP. 2020. Snapshot study of whole genome sequences of *Escherichia coli* from healthy companion animals, livestock, wildlife, humans and food in Italy. *Antibiotics.* 9:782.

- Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, Willemse N, Melles DC, Penders J, Vinh TN, Thi Hoa N, Bootsma MCJ, van Genderen PJ, Goorhuis A, Grobusch M, Molhoek N, Oude Lashof AML, Stobberingh EE, Verbrugh HA, de Jong MD, Schultsz C. 2017. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep.* 7(1):15364. doi: 10.1038/s41598-017-15539-7.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 41(11):5113-20. doi: 10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003.
- Melo LC, Boisson MN, Saras E, Médaille C, Boulouis HJ, Madec JY, Haenni M. 2017. OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog. *J Antimicrob Chemother.* 72:1256-8.
- Mendonça N, Figueiredo R, Mendes C, Card RM, Anjum MF, Silva GJ. 2016. Microarray evaluation of antimicrobial resistance and virulence of *Escherichia coli* isolates from Portuguese poultry. *Antibiotics* 5, 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5010004>.
- Merle R, Hajek P, Käsbohrer A, Hegger-Gravenhorst C, Mollenhauer Y, Robanus M, Ungemach FR, Kreienbrock L. 2012. Monitoring of antibiotic consumption in livestock: a German feasibility study. *Prev Vet Med.* 104(1-2):34-43. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.10.013.
- Miele M, Martins FM. 2021. Panorama da Suinocultura. *Embrapa Anuário 2022 da suinocultura industrial.* 6, 14:19.
- Migura-Garcia L, González-López JJ, Martínez-Urtaza J, Aguirre Sánchez JR, Moreno-Mingorance A, Perez de Rozas A, Höfle U, Ramiro Y, Gonzalez-Escalona N. 2020. *mcr*-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in *Escherichia coli* of Pigs and White Stork in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03072>.
- Mobasser G, Teh CSJ, Ooi PT, Thong KL. 2019. The emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from swine in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist.* 17:227-232. doi: 10.1016/j.jgar.2018.12.015.
- Mollenkopf DF, Stull JW, Mathys DA, Bowman AS, Feicht SM, Grooters SV, Daniels JB, Wittum TE. 2017. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae recovered from the environment of a swine farrow-to-finish operation in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 61: e01298-16. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01298-16>.
- Monroe S, Polk R. 2000. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol.* 3(5):496-501.

- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 67(4):906-9. doi: 10.1093/jac/dkr563.
- Moumouni A, Diagbouga S, Nadembèga C, Metuor Dabire A, Salah F, Obiri-Yeboah D, Soubéiga ST, Ouattara K, Zohoncon T, Djigma F, Langendorf C, Simporé J. 2017. Quinolone Resistance (qnr) genes in fecal carriage of extended Spectrum beta-lactamases producing Enterobacteria isolated from children in Niger. *Curr Res Microbiol Biotechnol.* 5(1):953–957.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 13(9):785-796.
- Nakano A, Nakano R, Nishisouzu R, Suzuki Y, Horiuchi S, Kikuchi-Ueda T, Ubagai T., Ono Y, Yano H. 2021. Prevalence and Relatedness of mcr-1-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan. *Front Microbiol.* 12:887. doi:10.3389/fmicb.2021.664931.
- Nguyen LP, Pinto NA, Vu TN, Mai H, Pham AH, Lee H, Cho YL, Byun JH, D'Souza R, Yong D. 2019. Resistome Profiles, Plasmid Typing, and Whole-Genome Phylogenetic Tree Analyses of BlaNDM-9 and Mcr-1 Co-Harboring *Escherichia coli* ST617 from a Patient without a History of Farm Exposure in Korea. *Pathogens.* 8:212. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040212>
- Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 27(3):543-74. doi: 10.1128/CMR.00125-13.
- Nordmann P, Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 8(6):321-31.
- Nordmann P, Poirel L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 56(3):463-9. doi: 10.1093/jac/dki245.
- Nordmann P, Poirel L. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect.* 22(5):398-400.
- O'Neill J. 2014. **Antimicrobial resistance**: tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance.
- O'Neill J. 2016. **Tackling Drug-resistant Infections Globally**: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. London: HM Government and the Wellcome Trust.

- Ohnishi M, Okatani AT, Esaki H, Harada K, Sawada T, Murakami M, Marumo K, Kato Y, Sato R, Shimura K, Hatanaka N, Takahashi T. 2013. Herd prevalence of Enterobacteriaceae producing CTX-M-type and CMY-2 β -lactamases among Japanese dairy farms. *J Appl Microbiol.* 115:282–9. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12211>.
- OIE – World Organisation for Animal Health. 2019. **Terrestrial Code**. 28th ed. Paris: World Organisation for Animal Health.
- OIE – World Organisation for Animal Health. 2020. **OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals - fourth report**. Paris: World Organisation for Animal Health.
- Ojdana D, Sacha P, Wieczorek P, Czaban S, Michalska A, Jaworowska J, Jurczak A, Poniatowski B, Trynieszewska E. 2014. The Occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Positive Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *Int J Antibiot.* Article ID 935842.
- Ojo OE, Schwarz S, Michael GB. 2016. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from chicken production chains in Nigeria. *Vet Microbiol.* 194:62–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.022>.
- Oliphant CM, Green GM. 2002. Quinolones: A comprehensive review. *Am. Fam. Physician.* 65:455-64.
- Oliveira J, Reygaert WC. 2019. **Gram Negative Bacteria**. USA: StatPearls Publishing; Treasure Island.
- Ori EL, Takagi EH, Andrade TS, Miguel BT, Cergole-Novella MC, Guth BEC, Hernandez RT, Dias RCB, Pinheiro SRS, Camargo CH, Romero EC, Dos Santos F. 2018. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect.* 147(e10):1-9.
- Park KS, Kim TY, Kim JH, Lee JH, Jeon JH, Karim AM, Malik SK, Lee SH. 2018. PNGM-1, a novel subclass B3 metallo- β -lactamase from a deep-sea sediment metagenome. *J Glob Antimicrob Resist.* 14:302-305. doi: 10.1016/j.jgar.2018.05.021.
- Park YS, Adams-Haduch JM, Rivera JI, Curry SR, Harrison LH, Doi Y. 2012. *Escherichia coli* producing CMY-2 β -lactamase in retail chicken, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *Emerg Infect Dis.* 18:515–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111434>.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4):657-86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.

- Peng Z, Zhang X, Li X, Hu Z, Li Z, Jia C, Dai M, Tan C, Chen H, Wang X. 2021. Characteristics of colistin-resistant *Escherichia coli* from pig farms in Central China. *Animal Diseases*. 1:9. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00009-5>.
- Perdigão Neto LV, Corscadden L, Martins RCR, Nagano DS, Cunha MPV, Neves PR, Franco LAM, Moura MLN, Rizek CF, Guimarães T, Boszczowski Í, Rossi F, Levin AS, Stabler RA, Costa SF. 2019. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. *Infection*. 47(4):661-664. doi: 10.1007/s15010-019-01309-2.
- Périchon B, Courvalin P, Galimand M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51:2464-2469.
- Perry J, Waglechner N, Wright G. 2016. The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(6):a025197. doi: 10.1101/cshperspect.a025197.
- Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. 2016. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. 16(3):280. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00005-0.
- Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. 2019. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*. 10(10):1719–39.
- Pharmaceuticals LC. 2015. China's lakes of pig manure spawn antibiotic resistance. *Science*. 347(6223):704. doi: 10.1126/science.347.6223.704.
- Piddock LJ. 2012. The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *Lancet Infect Dis*. 12(3):249-53. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70316-4.
- Pires J, Novais A, Peixe L. 2013. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 51(12):4281-3. doi: 10.1128/JCM.01634-13.
- Pissetti C, Kich JD, Allen HK, Navarrete C, de Freitas Costa E, Morés N, Cardoso M. 2021. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from pigs subjected to different antimicrobial administration protocols. *Res Vet Sci*. 137:174-185. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.05.001.
- Pitondo-Silva A, Devechio BB, Moretto JA, Stehling EG. 2016. High prevalence of blaVIM-1 gene in bacteria from Brazilian soil. *Can J Microbiol*. 62(10):820-826. doi: 10.1139/cjm-2015-0787.
- Pitout JD. 2012. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*. 3:9.

- Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017a. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 30(2):557-596. doi: 10.1128/CMR.00064-16.
- Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. 2017b. In Vitro Study of IS_{Apl1}-Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7): e00127-17. doi: 10.1128/AAC.00127-17.
- Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(12):3992-7.
- Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Poirel L, Stephan R, Perreten V, Nordmann P. 2014. The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit. *J Antimicrob Chemother.* 69:2007-2008 <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku054>.
- Pollock J, Muwonge A, Hutchings MR, Mainda G, Bronsvort BM, Gally DL, Corbishley A. 2020. Resistance to change: AMR gene dynamics on a commercial pig farm with high antimicrobial usage. *Sci Rep.* 10(1):1708. doi: 10.1038/s41598-020-58659-3.
- Postma M, Stärk KD, Sjölund M, Backhans A, Beilage EG, Lösken S, Belloc C, Collineau L, Iten D, Visschers V, Nielsen EO, Dewulf J. 2015. Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Prev Vet Med.* 118(4):457-66. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.01.010.
- Prakasan S, Prabhakar P, Lekshmi M, Nayak BB, Kumar S. 2018. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring variant Shiga toxin genes from seafood. *Veterinary World.* 11:379-385. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.379-385>.
- Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C. 2017. First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *Int J Antimicrob Agents.* 50:232-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.014>.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):440-58.
- Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. 2019. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 51:93-100. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.001.

- R Core Team. 2019. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahimi F, Katouli M, Karimi S. 2016. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microb Pathog*. 98:69-76. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.031.
- Rajić A, Reid-Smith R, Deckert A, Dewey C, McEwen S. 2006. Antibiotic use in swine farms in Alberta - A reply. *Canadian Veterinary Journal*. 47(12):1153.
- Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, CliftonHadley FA, Davies RH, Teale CJ. 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother*. 66:86–95. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq396>.
- Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. 2014. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol*. 37(1):1-15.
- Rau RB, De Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Barth AL. 2020. Salmonella enterica mcr-1 positive from food in Brazil: detection and characterization. *Foodborne Pathog Dis*. 7:202-8. doi: 10.1089/fpd.2019.2700.
- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. 2014. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 22:438-445. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007.
- Reid CJ, Demaere MZ, Djordjevic SP. 2019. Australian porcine clonal complex 10 (CC10) *Escherichia coli* belong to multiple sublineages of a highly diverse global CC10 phylogeny. *Microb. Genom*. 5: e000225.
- Riley LW. 2020. Extraintestinal Foodborne Pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol*. 11:275-294. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051618.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Hye Park C, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med*. 12:83-88. doi: 10.1038/nm1347.
- Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y, Torres C. 2015. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Vet J* 203: 315-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>.
- Rochelle-Newall E, Nguyen TM, Le TP, Sengtaheuanghoung O, Ribolzi O. 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. *Front Microbiol*. 6:308. doi: 10.3389/fmicb.2015.00308.

- Roer L, Hansen F, Thomsen MCF, Knudsen JD, Hansen DS, Wang M, Samulioniené J, Justesen US, Røder BL, Schumacher H, Østergaard C, Andersen LP, Dzajic E, Søndergaard TS, Stegger M, Hammerum AM, Hasman H. 2017. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *J Antimicrob Chemother.* 72(7):1922-1929. doi: 10.1093/jac/dkx092.
- Roer L, Johannesen TB, Hansen F, Stegger M, Tchesnokova V, Sokurenko E, Garibay N, Allesøe R, Thomsen MCF, Lund O, Hasman H, Hammerum AM. 2018. CHTyper, a Web Tool for Subtyping of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Based on the *fumC* and *fimH* Alleles. *J Clin Microbiol.* 56(4):e00063-18. doi: 10.1128/JCM.00063-18.
- Roschanski N, Friese A, von Salviati-Claudius C, Hering J, Kaesbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. 2017a. Prevalence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolated from German pigfattening farms during the years 2011–2013. *Vet Microbiol.* 200:124-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.030>.
- Roschanski N, Guenther S, Vu TTT, Fischer J, Semmler T, Huehn S, Alter T, Roesler U. 2017b. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from retail seafood, Germany 2016. *Euro Surveill.* 22:17-00032. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.43.17-00032>.
- Rumi MV, Mas J, Elena A, Cerdeira L, Muñoz ME, Lincopan N, Gentilini ÉR, Di Conza J, Gutkind G. 2019. Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. *Vet Microbiol.* 230:228-234. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.006.
- Ruppé E, Woerther PL, Barbier F. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensiv. Care.* 5:61. doi: 10.1186/s13613-015-0061-0.
- Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Arévalo SA, Reyes J, Hidalgo AM, de la Cadena E, Perenguez M, Montañó LA, Ardila J, Ríos R, Ovalle MV, Díaz P, Porras P, Villegas MV, Arias CA, Beltrán M, Duarte C. 2017. Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(12):e00841-17. doi: 10.1128/AAC.00841-17.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 18(4):20380. doi: 10.2807/ese.18.04.20380-en.
- Sacramento AG, Fernandes MR, Sellera FP, Muñoz ME, Vivas R, Dolabella SS, Lincopan N. 2018. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 15:288-289. doi: 10.1016/j.jgar.2018.10.024.

- Sader HS, Rhomberg PR, Farrell DJ, Jones RN. 2015. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 83(4):379-81. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.013.
- Sakai Y, Qin L, Miura M, Masunaga K, Tanamachi C, Iwahashi J, Kida Y, Takasu O, Sakamoto T, Watanabe H. 2016. Successful infection control for a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service centre. *J Hosp Infect*. 92(4):385-91. doi: 10.1016/j.jhin.2015.12.016.
- Salak-Johnson JL, McGlone JJ. 2007. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *J Anim Sci*. 85(13 Suppl):E81-8. doi: 10.2527/jas.2006-538.
- Sali V, Nykäsenoja S, Heikinheimo A, Hälli O, Tirkkonen T, Heinonen M. 2021. Antimicrobial Use and Susceptibility of Indicator *Escherichia coli* in Finnish Integrated Pork Production. *Front. Microbiol*. 12:754894. doi: 10.3389/fmicb.2021.754894
- Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogestraat DR, Cookson BT. 2015. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(4):1072-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-14>.
- Sarrazin S, Joosten P, Van Gompel L, Luiken REC, Mevius DJ, Wagenaar JA, Heederik DJJ, Dewulf J. 2018. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *J Antimicrob Chemoth*. 74:807-16.
- Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. 2014. Phylogenetic association of fluoroquinolone and cephalosporin resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying blaCMY-2 from faecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol*. 63:263-70. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.054676-0>.
- Scaria J, Chandramouli U, Verma SK. 2005. Antibiotic Resistance Genes Online (ARGO): a Database on vancomycin and beta-lactam resistance genes. *Bioinformatics*. 1:5-7. doi: 10.6026/97320630001005.
- Schages L, Wichern F, Kalscheuer R, Bockmühl D. 2020. Winter is coming - Impact of temperature on the variation of beta-lactamase and mcr genes in a wastewater treatment plant. *Sci Total Environ*. 712:136499. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136499.
- Schill F, Abdulmawjood A, Klein G, Reich F. 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *Int J Food Microbiol*. 257:58-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010>.

- Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, PrengerBerninghoff E, Imirzalioglu C, Chakraborty T. 2014. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* 14:187-200. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-187>.
- Scott MJ, Benoit JB, Davis RJ, Bailey ST, Varga V, Martinson EO, Hickner PV, Syed Z, Cardoso GA, Torres TT, Weirauch MT, Scholl EH, Phillippy AM, Sagel A, Vasquez M, Quintero G, Skoda SR. 2020. Genomic analyses of a livestock pest, the New World screwworm, find potential targets for genetic control programs. *Commun Biol.* 3(1):424. doi: 10.1038/s42003-020-01152-4.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30(14):2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sellera FP, Fernandes MR, Ruiz R, Falleiros ACM, Rodrigues FP, Cerdeira L, Lincopan N. 2018. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. *J Antimicrob Chemother.* 73(8):2259-61. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dky173>.
- Sellera FP, Fernandes MR, Sartori L, Carvalho MP, Esposito F, Nascimento CL, Dutra GH, Mamizuka EM, Pérez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Lincopan N. 2017. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and blaCTX-M genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Antimicrob Chemother.* 72(4):1255-1256. doi: 10.1093/jac/dkw543.
- Shaheen BW, Nayak R, Boothe DM. 2013. Emergence of a New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2902-03. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02028-12>.
- Shen Y, Wu Z, Wang Y, Zhang R, Zhou HW, Wang S, Lei L, Li M, Cai J, Tyrrell J, Tian GB, Wu C, Zhang Q, Shen J, Walsh TR, Shen Z. 2018. Heterogeneous and Flexible Transmission of mcr-1 in Hospital-Associated *Escherichia coli*. *mBio.* 9(4):e00943-18. doi: 10.1128/mBio.00943-18.
- Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. 2016. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis.* 16(3):293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X.
- Silbergeld EK, Graham J, Price LB. 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health.* 29:151-169.
- Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A; Bacterial Resistance Consortium, Garza-Ramos U. 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One.* 8(10):e77968. doi: 10.1371/journal.pone.0077968.

- SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. 2021. Estatísticas. Disponível em: <<https://www.sindan.org.br/wpcontent/uploads/2021/06/FechamentoMercado2020.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- Singer RS, Reid-Smith R, Sisco WM. 2006. Stakeholder position paper: Epidemiological perspectives on antibiotic use in animals. *Prev. Vet. Med.* 73:153-61.
- Skov RL, Monnet DL. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21(9):30155. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155.
- Smith JL, Fratamico PM. 2018. Emerging and Re-Emerging Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease.* 15(12):737-57. <http://doi.org/10.1089/fpd.2018.2493>.
- Snesrud E, He S, Chandler M, Dekker JP, Hickman AB, McGann P, Dyda F. 2016. A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* by IS*Ap11*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(11):6973-6976. doi: 10.1128/AAC.01457-16.
- Snesrud E, Ong AC, Corey B, Kwak YI, Clifford R, Gleeson T, Wood S, Whitman TJ, Lesho EP, Hinkle M, McGann P. 2017. Analysis of Serial Isolates of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* Reveals a Highly Active IS*Ap11* Transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(5):e00056-17. doi: 10.1128/AAC.00056-17.
- Solgi H, Shahcheraghi F, Bolourchi N, Ahmadi A. 2020. Molecular characterization of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 harbouring bla_{NDM-1} and bla_{OXA-48} carbapenemases in Iran. *Microb Pathog.* 149:104507. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104507.
- Soncini JGM, Cerdeira L, Koga VL, Tizura AT, Fuga B, Nakazato G, Kobayashi RKT, Aires C A M, Lincopan N, Vespero EC. 2021. Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in Southern Brazil. *BioRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.424884>.
- Spindola MG, Cunha MPV, Moreno LZ, Amigo CR, Silva APS, Parra BM, Poor AP, de Oliveira CH, Perez BP, Knöbl T, Moreno AM. 2018. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows. *Vet Q.* 38(1):79-87. doi: 10.1080/01652176.2018.1519321.
- Spinosa HS; Gorniak SL, Bernardi MM. 2011. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 824 p.
- Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Pfeifer Y, Ewers C. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother.* 68:2802-2808. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt259>.

- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):664–689. doi: 10.1128/CMR.00016-09.
- Street BR, Gonyou HW. 2008. Effects of housing finishing pigs in two group sizes and at two floor space allocations on production, health, behavior, and physiological variables. *J Anim Sci.* 86(4):982-91. doi: 10.2527/jas.2007-0449.
- Tang F, Wang J, Li D, Gao S, Ren J, Ma L, Liu F, Zhuge X, Yan G, Lu Y, Dai J. 2019. Comparative genomic analysis of 127 *Escherichia coli* strains isolated from domestic animals with diarrhea in China. *BMC Genomics.* 20(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5588-2>.
- Tarakdjian J, Capello K, Pasqualin D, Santini A, Cunial G, Scollo A, Mannelli A, Tomao P, Vonesch N, Di Martino G. 2020. Antimicrobial use on Italian Pig Farms and its Relationship with Husbandry Practices. *Animals.* 10:417. <https://doi.org/10.3390/ani10030417>.
- Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW. 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 43:5860-4.
- Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Economics of antibiotic use in US swine and poultry production. *Choices.* 30(1):1-11.
- Tenaillon O, Barrick JE, Ribeck N, Deatherage DE, Blanchard JL, Dasgupta A, Wu GC, Wielgoss S, Cruveiller S, Médigue C, Schneider D, Lenski RE. 2016. Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature.* 536(7615):165-70. doi: 10.1038/nature18959.
- Timofta D, Maciuca IE, Williams NJ, Wattret A, Schmidt V. 2016. Veterinary hospital dissemination of CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 in the United Kingdom. *Microb Drug Resist.* 22:609-615. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0036>.
- Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP. 2020. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics,* 9(12):918.
- Toleman MA, Burget JJ, Nizam SA. 2015. Extensively drug-resistant New Delhimetallo-beta-lactamase-encoding bacteria in the environment, Dhaka, Bangladesh, 2012. *Emerg Infect Dis.* 21(6):1027-30.
- Tong H, Liu J, Yao X, Jia H, Wei J, Shao D, Liu K, Qiu Y, Ma Z, Li B. 2018. High carriage rate of mcr-1 and antimicrobial resistance profiles of mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China. *Vet Microbiol.* 225:53-57. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.018.
- Torres A, Amaral M, Bentancor L, Galli L, Goldstein J, Krüger A, Rojas-Lopez M. 2018. Recent advances in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* research in Latin

America. Microorganisms, 6(4):100.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6040100>.

- Touchon M, Perrin A, de Sousa JAM, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, Denamur E, Gordon D, Rocha EP. 2020. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. PLoS Genet. 16(6):e1008866. doi: 10.1371/journal.pgen.1008866.
- Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. 2011. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 55(4):1485-93. doi: 10.1128/AAC.01275-10.
- Tse H, Yuen KY. 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 16(2):145-6. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00532-0.
- Tümmler B. 2020. Molecular epidemiology in current times. Environ Microbiol. 22(12):4909-4918. doi: 10.1111/1462-2920.15238.
- UE – European Parliament And The Council Of The European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Off. J. Eur. Union. 268:29-43.
- Umeda K, Hase A, Fukuda A, Matsuo M, Horimoto T, Ogasawara J. 2019. Prevalence and mechanisms of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among sheltered companion animals. Access Microbiol. 2(1):acmi000077. doi: 10.1099/acmi.0.000077.
- USDA – United States Department of Agriculture. 2021. **Foreign Agricultural Service.** Official USDA Estimates. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci U S A. 112(18):5649-54. doi: 10.1073/pnas.1503141112.
- Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, Levin SA, Bonhoeffer S, Laxminarayan R. 2017. Reducing antimicrobial use in food animals. Science. 357(6358):1350-2. doi: 10.1126/science.aao1495.
- Van Goethem MW, Pierneef R, Bezuidt OK, Van De Peer Y, Cowan DA, Makhalanyane TP. 2018. A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. Microbiome. 6(1):40.
- Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Frontiers in Microbiology. 2(203).

- Van Rennings L, Von Münchhausen C, Otilie H, Hartmann M, Merle R, Honscha W. 2015. Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany. PLoS ONE. 10(3): e0119114. doi: 10.1371/journal.pone.0119114.
- Varela AR, Manageiro V, Ferreira E, Guimarães MA, da Costa PM, Caniça M, Manaia CM. 2015. Molecular evidence of the close relatedness of clinical, gull and wastewater isolates of quinolone-resistant *Escherichia coli*. J. Glob. Antimicrob. Resist. 3:286-289. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jgar.2015.07.008>.
- Varela NP, Gadbois P, Thibault C, Gottschalk M, Dick P, Wilson J. 2013. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. Anim Health Res Rev. 14:68-77. <https://doi.org/10.1017/S1466252313000029>.
- Varga C, Rajić A, McFall ME, Reid-Smith RJ, Deckert AE, Checkley SL, McEwen AS. 2009. Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms. Prev. Vet. Med. 88: 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.10.002>.
- Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, De Frutos Escobar C, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. J Antimicrob Chemother. 66:1278-6. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr084>.
- Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, deSchaezen MA, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, DeBlock J, Dewulf J, Herman L. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. Int J Environ Res Public Health. 10(7):2643-69.
- Vieira AR, Houe H, Wegener HC, Lo Fo Wong, DMA, Emborg HD. 2009. Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy Danish slaughter pigs. Foodborne Pathog. Dis. 6:99-109.
- Vinué L, Sater MRA, Herriott IC, Huntley MH, Wang M, Jacoby GA, Hooper DC. 2020. Plasmids and genes contributing to high-level quinolone resistance in *Escherichia coli*. Int. J. Antimicrob. Agents. 56(1):105987. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105987.
- Vogt D, Overesch G, Endimiani A, Collaud A, Thomann A, Perreten V. 2014. Occurrence and genetic characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Swiss retail meat. Microb Drug Resist. 20:485-94. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2013.0210>.
- Walker KJ, Lee YR, Klar AR. 2018. Clinical Outcomes of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Infections with Susceptibilities among

- Levofloxacin, Cefepime, and Carbapenems. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2018;6. doi: 10.1155/2018/3747521.
- Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. 2020. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect.* 9:508-16. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231.
- Wang Q, Sun J, Li J, Ding Y, Li XP, Lin J, Hassan B, Feng Y. 2017. Expanding landscapes of the diversified *mcr-1*-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome.* 5(1):70.
- Wang Q, Wang X, Wang J, Ouyang P, Jin C, Wang R, Zhang Y, Jin L, Chen H, Wang Z, Zhang F, Cao B, Xie L, Liao K, Gu B, Yang C, Liu Z, Ma X, Jin L, Zhang X, Man S, Li W, Pei F, Xu X, Jin Y, Ji P, Wang H. 2018. Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Data From a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012-2016). *Clin Infect Dis.* 67(suppl_2):S196-S205. doi: 10.1093/cid/ciy660.
- Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Liu Y, Rieux A, Dorai-Schneiders T, Weinert LA, Iqbal Z, Didelot X, Wang H, Balloux F. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun.* 9(1):1179. doi: 10.1038/s41467-018-03205-z.
- Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, Tyrrell JM, Zheng Y, Wang S, Shen Z, Liu Z, Liu J, Lei L, Li M, Zhang Q, Wu C, Zhang Q, Wu Y, Walsh TR, Shen J. 2017. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol.* 2:16260. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.260>.
- Wang Y, Zhou J, Li X, Ma L, Cao X, Hu W, Zhao L, Jing W, Lan X, Li Y, Gong X, Chen Q, Stipkvits L, Szathmary S, Tarasiuk K, Pejsak Z, Liu Y. 2020. Genetic diversity, antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamase type of *Escherichia coli* isolates from chicken, dog, pig and yak in Gansu and Qinghai Provinces, China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22:726-732. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.028>.
- Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Cookson BT, Fang FC, Scholes D, Chattopadhyay S, Sokurenko E. 2012. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 78(5):1353-60. doi: 10.1128/AEM.06663-11.
- WHO – World Health Organization. 2012. **The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action.** Geneva: WHO.
- WHO – World Health Organization. 2014. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** Paris: World Health Organization.

- WHO – World Health Organization. 2017. **Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria**: Application of a One Health Approach. Geneva: World Health Organization.
- WHO – World Health Organization. 2018. **Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance**: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey 2018.
- WHO – World Health Organization. 2022. **Critically important antimicrobials for human medicine – 5th rev**. Geneva: World Health Organization.
- Wilbert CA, Mores N, Klein CH, de Lima GJMM, Schmidt NS. 2019. Sistema de produção de suínos em família sem o uso coletivo de antimicrobianos – Regulamento. Embrapa Comunicado Técnico. 557:1-6.
- Wilson H, Török ME. 2018. Extended-spectrum b-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb. Genom.* 4:e000197.
- Wink PL, Martins AS, Volpato F, Zavascki AP, Barth AL. 2021. Increased frequency of blaNDM in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Microbiol.* 52, 299-301. doi:10.1007/s42770-020-00412-z.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology.* 60(5):1136-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Wright GD, Poinar H. 2012. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends in Microbiology,* 20(4):157-159. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.002>
- Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 21(27). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.
- Xiaomin S, Yiming L, Yuying Y, Zhangqi S, Yongning W, Shaolin W. 2020. Global impact of mcr-1-positive Enterobacteriaceae bacteria on "one health". *Crit Rev Microbiol.* 46(5):565-577. doi: 10.1080/1040841X.2020.1812510.
- Xiong W, Sun Y, Zeng Z. 2018. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research.* 25(19):18377-18384.
- Yaici L, Haenni M, Saras E, Boudehouche W, Touati A, Madec JY. 2016. blaNDM-5-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 71:2671–72. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw160>.

- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3354-60.
- Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. 2018. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 73(7):1791-1795. doi: 10.1093/jac/dky111.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3):e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17.
- Yousfi M, Touati A, Mairi A, Brasme L, Gharout-Sait A, Guillard T, De Champs C. 2016. Emergence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from companion animals in Algeria. *Microb Drug Resist.* 22:342-6. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2015.0196>.
- Yuan J, Wang X, Shi D, Ge Q, Song X, Hu W, We, D, Ge C, Li X, Hu C. 2021. Extensive antimicrobial resistance and plasmid-carrying resistance genes in *mcr-1*-positive *E. coli* sampled in swine, in Guangxi, South China. *BMC veterinary research*, 17(1):86. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02758-4>.
- Yue L, Jiang HX, Liao XP, Liu JH, Li SJ, Chen XY, Chen CX, Lü DH, Liu YH. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 132(3-4):414-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.009.
- Zamparette CP, Schorner M, Campos E, Moura Q, Cerdeira L, Tartari DC, Sereia AFR, Cunha P, Fontana H, de Oliveira LFV, Grisard EC, Lincopan N, Bazzo ML, Sincero TCM. 2020. IncX4 Plasmid-Mediated *mcr-1.1* in Polymyxin-Resistant *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. *Microb Drug Resist.* 6(11):1326-1333. doi: 10.1089/mdr.2019.0203.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 60(6):1206-15. doi: 10.1093/jac/dkm357.
- Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, Smith H, Hoban DJ. 2002. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs.* 62(1):13-59. doi: 10.2165/00003495-200262010-00002.
- Zhang J, Chen L, Wang J, Yassin AK, Butaye P, Kelly P, Gong J, Guo W, Li J, Li M, Yang F, Feng Z, Jiang P, Song C, Wang Y, You J, Yang Y, Price S, Qi K, Kang Y, Wang C. 2018. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and

mcr-3) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. *Sci Rep.* 8: 3705. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22084-4>.

Zhao Z, Wang C, Xue Y, Tang X, Wu B, Cheng X, He Q, Chen H. 2011. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *Vet J.* 188:337-40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.022>.

Zhou H, Yang Q, Yu YS, Wei ZQ, Li LJ. 2007. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. *J Clin Microbiol.* 45(12):4054-7.

Zhou HW, Zhang T, Ma JH, Fang Y, Wang HY, Huang ZX, Wang Y, Wu C, Chen GX. 2017. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried mcr-1 in Waterborne Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(8):e00017-17. doi: 10.1128/AAC.00017-17.

Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stephenson GW. 2012. **Diseases of swine.** 10th ed. Chichester, UK: Wiley.

Zurfluh K, Albin S, Mattmann P, Kindle P, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R, Vogler BR. 2019. Antimicrobial resistant and extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in common wild bird species in Switzerland. *Microbiologyopen.* 8(11):e845. doi: 10.1002/mbo3.845.

APÊNDICE 1 – TCLE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ANIMAIS)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Caracterização de genes de resistência de isolados de *E. coli* provenientes de suínos, avaliação dos diferentes perfis clonais circulantes e sua relação com resíduos de antibióticos no ambiente e na carne in natura.

Nome do(a) Pesquisador(a) Responsável/Professor(a):

Dra. Andreza Francisco Martins – Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Nome dos demais participantes da equipe:

- 1) **Silvia Adriana Mayer Lentz – Médica Veterinária** – Doutoranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS – ICBS
- 2) **Paula Marques Rivas** - Médica Veterinária - Prefeitura Municipal de Porto Alegre - Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde - Equipe de Vigilância de Alimentos
- 3) **Franciele Caroline Adam** - Estudante Graduação Biomedicina UFRGS – Iniciação Científica
- 4) **Prof. Dr. Afonso Luís Barth** – Professor Titular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Centro de Pesquisas Experimental do HCPA.

Natureza da pesquisa/aula: O Sr.(Sra.) está sendo convidado(a) a autorizar a participação dos animais que são abatidos em sua indústria nesta pesquisa que tem como finalidade analisar a prevalência de genes de resistência a polimixinas, quinolonas e β -lactâmicos em *E. coli* provenientes de suínos.

Identificação do(s) animal(is): 384 suínos (*Sus scrofa domesticus*).

Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador(a)/professor(a) realize a coleta de amostras de *E. coli* que serão obtidas através da introdução de swab retal nos suínos. As coletas serão realizadas, realizando-se movimentos circulares no orifício para a obtenção da amostra. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa/aula, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa/aula através do telefone do(a)

pesquisador(a)/professor(a). Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Sobre os dados necessários: será preenchido um formulário no momento das coletas baseado na ficha de inspeção sanitária do lote.

Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa/aula não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008.

Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores/professor(a)(s) terão conhecimento dos dados.

Benefícios: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a presença dos diferentes genes de resistência, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para estudos futuros e desenvolvimento de políticas públicas de controle, o pesquisador/professor(a) se compromete a divulgar os resultados obtidos do estudo à Empresa.

Pagamento: informamos que não será necessário nenhum pagamento por parte da Empresa e que os custos desta pesquisa estão sendo providos através de verbas do Pesquisador.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seus animais nesta pesquisa. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Proprietário: _____ CNPJ _____

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

TELEFONES: Pesquisador: Silvia Adriana Mayer Lentz 51 99151-8108

Orientador: Andreza Francisco Martins 51 3308-3422 **CEUA/UFRGS:** 51 3308-3738

APÊNDICE 2 – ARTIGO 1 – ARTIGO PUBLICADO



mcr-1 Gene in Latin America: How Is It Disseminated Among Humans, Animals, and the Environment?

Silvia Adriana Mayer Lentz^{1,2}, Tanise Vendruscolo Dalmolin³, Afonso Luís Barth⁴ and Andreza Francisco Martins^{1,2,4*}

¹ Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e Do Ambiente, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil, ² Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³ Faculdade de Saúde, Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ⁴ Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Keywords: *mcr-1* gene, IncX4 plasmid type, colistin resistance, Latin America, antimicrobial resistance

INTRODUCTION

In the last decade, polymyxins have been reintroduced in the therapeutic arsenal to treat severe infections by carbapenem-resistant Enterobacterales. At that time, reports of polymyxin resistance were all due to chromosomal mutations (1). These mechanisms included (i) modifications of the lipopolysaccharides (LPSs) moiety via the addition of cationic groups; (ii) mutations that lead to the loss of the LPS; (iii) porin mutations and overexpression of efflux pump systems; (iv) overproduction of capsular polysaccharide (CPS) in some Gram-negative bacteria (GNB) that hide the polymyxin-binding sites and the release of CPS-trapping polymyxins; and (v) enzymatic inactivation of polymyxins (2). Although some chromosomal resistance mechanisms have been studied since the 1960's, it was in the late 1990's, after the reintroduction of polymyxins in the therapeutic arsenal, that this problem became more important (3). In fact, this information is supported by the first report of colistin resistance among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Czech Republic in 1999 and *Klebsiella pneumoniae* from Athens in 2004 (4).

However, in 2015, the *mcr-1* gene, associated with IncI2-type plasmid, was identified in *Escherichia coli* resistant to colistin obtained from food animals and humans in China (1). This finding promoted a great concern in the international scientific community since the last therapeutic option to treat serious infections by multidrug-resistant GNB could be exhausted. With the horizontal transfer, the rapid spread of the *mcr-1* gene would be inevitable.

The *mcr-1* gene carried by different plasmid types has already been identified in all five continents from different sources and hosts (1, 5). Surprisingly, Shen and colleagues, in a retrospective study, characterized the early occurrence of the *mcr-1* gene in chicken isolates from 1980's (6).

So far, a total of 10 different variants (7) of the *mcr* gene have been described mainly among the Enterobacterales, but with the *mcr-1* gene remaining the most prevalent (1). To date, the sequences of 30 *mcr-1* mutations (*mcr-1.2* to *mcr-1.30*) have already been deposited in the GenBank database, differing from *mcr-1* by one or few amino acids. Besides that, 10 *mcr* gene variants (*mcr-1* to *mcr-10*) were deposited, with amino acid identity ranging from 31 to 83% (8). These variants were identified at the beginning in Enterobacterales isolates, including *E. coli* (*mcr-1*, *mcr-2*, and *mcr-3* genes), *Salmonella enterica* (*mcr-4*, *mcr-5* and *mcr-9* genes), *K. pneumoniae* (*mcr-7* and *mcr-8* genes), and *Enterobacter rogenkampii* (*mcr-10* gene). The exception is due to *mcr-6* gene that was first identified in *Moraxella* spp. After that, some variants were identified in non-fermenter

OPEN ACCESS

Edited by:

Swaminath Srinivas,
University of Illinois at
Urbana-Champaign, United States

Reviewed by:

Ridwan Bin Rashid,
State University of
Bangladesh, Bangladesh

*Correspondence:

Andreza Francisco Martins
andrezafm20@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Planetary Health,
a section of the journal
Frontiers in Public Health

Received: 02 January 2021

Accepted: 22 February 2021

Published: 07 May 2021

Citation:

Lentz SAM, Dalmolin TV, Barth AL and
Martins AF (2021) *mcr-1* Gene in Latin
America: How Is It Disseminated
Among Humans, Animals, and the
Environment?
Front. Public Health 9:648940.
doi: 10.3389/fpubh.2021.648940

Gram-negative rods, as *Acinetobacter* spp. (*mcr-1* and *mcr-4*) and *Pseudomonas* spp. (*mcr-1* only) (9, 10).

In general, the isolates carrying *mcr* genes were first isolated from animals such as pigs (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-6*, and *mcr-8* genes) and chickens (*mcr-5* and *mcr-7* genes), but *mcr-9* and *mcr-10* genes were identified, for the first time, from human patients (8).

EPIDEMIOLOGY OF POLYMYXIN RESISTANCE

The resistance to polymyxins was attributed mainly to chromosomal mutations and is rare in human clinical isolates (0.67–1.6%) (11). Nevertheless, this differs among bacteria species, being higher in *K. pneumoniae* and *A. baumannii* (20–80%) (4) in contrast to lower rates in *E. coli* (0.2–0.6%) (11).

The polymyxin resistance rate associated to plasmid, as *mcr-1*, is also low in humans (~1%) (4). On the other hand, according to a large US surveillance study, the association between *mcr-1* and other antibiotic resistance genes, such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemases, may reach 32% of prevalence in *K. pneumoniae* (11). Regarding the mortality associated with infections caused by colistin-resistant isolates in humans, the rate is variable, and it is higher in critically ill patients (30–37%) including those previously exposed to colistin (4). The mortality rate may reach 100% in patients with nosocomial infections caused by pan-drug-resistant *K. pneumoniae*.

It is important to emphasize that the prevalence of *mcr-1* gene is higher among production animals, mainly in pig and chicken isolates (5). The data show colistin resistance rates of ~70% in *E. coli* isolates from China and ~90% among Enterobacterales in some European countries (8). So, these data corroborate with the scientific evidence that the worldwide spread of the *mcr-1* gene is mainly associated with the large amounts of colistin use in production animals, and its emergence is a particular threat to public health as colistin is considered the last-resort antimicrobial for treatment of severe human infections, and its use in livestock production contributes to emerging resistance globally (1).

mcr-1 IN LATIN AMERICA

In Latin America, a systematic review analysis showed that the prevalence of *mcr-1* gene is higher in isolates from animals (8.7%) than in food (5.4%) and humans (2.0%) (12). To the best of our knowledge, the first reports of *mcr-1* gene in Latin America dated from July and October 2012 when this gene was identified in *E. coli* isolates from two inpatients in different hospitals in Argentina (Table 1) (13). Patients presented neurological disease and diabetes, and the *mcr-1*-positive isolates were obtained from blood and urine, respectively. In this study, the authors evaluated the presence of the *mcr-1* gene in 87 colistin-resistant clinical human isolates from 2008 to 2016 (28 *E. coli*, 19 *K. pneumoniae*, 36 of other members of the Enterobacterales, and 4 non-fermenter Gram-negative rods), and nine isolates of *E. coli* were *mcr-1* positive. These isolates were associated

with human infections, mainly in males, and the average age of the patients was 68.5 years. All *mcr-1*-positive *E. coli* isolates were genetically unrelated as determined by pulsed-field gel electrophoresis, and the resistance mechanism was horizontally transferable by conjugation (13). Still, in 2012, other studies reported *mcr-1* harboring *E. coli* recovered from Kelp Gulls in Argentina (14) and from swine in Brazil (Table 1) (15).

Since 2012, the *mcr-1* gene has already been identified in bacteria from humans, animals, animal food products, and environmental sources in different countries in Latin America, including Brazil (15), Bolivia (16), Colombia (17), Chile (18), Uruguay (19), Paraguay (20), Peru (21), Mexico (22), Venezuela (23), and Ecuador (24). Brazil is the country with the highest number of *mcr-1*-positive bacteria reported in Latin America mainly from bacterial isolates obtained from poultry rectal swabs (15) (Table 1).

It is important to consider that Brazil is the fourth largest pork producer and exporter and the largest chicken meat exporter in the world, which could contribute to the high prevalence of the *mcr-1* gene in this country (25). As in other countries, the colistin was extensively used in Brazil as a growth promoter for many years. In 2016, the government published restrictions on the use of colistin in animal production (1, 26), which came into force in 2018. However, the use of colistin to treat or prevent infections in veterinary medicine including animal productions is still allowed.

E. coli is the most common species harboring the *mcr-1* gene in Latin America countries. However, many other Enterobacterales members such as *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., and *Enterobacter* spp. were also reported as positive for the *mcr-1* gene (17, 27). In addition to *mcr-1*, other variants of the gene were reported rarely in Latin America, such as *mcr-3*, *mcr-5*, *mcr-7*, and *mcr-9* (28–30).

GENETIC CONTEXT AND DISSEMINATION OF mcr-1 GENE

E. coli isolates harboring *mcr-1* gene belong to different sequence types (STs) (31, 32) (Table 1), indicating that the dissemination of the *mcr-1* gene is associated with different clonal strains (1). Loayza-Villa and colleagues investigated the relationship between an *E. coli* carrying *mcr-1* recovered from the gastrointestinal tract of a boy and an *mcr-1*-positive *E. coli* from fecal samples and rectal/cloacal swabs from his domestic animals. *E. coli* strains from domestic animals and from the boy were different; however, all plasmids harboring the *mcr-1* gene shared 90% nucleotide identity and a highly conserved backbone, supporting the idea of horizontal dissemination of the *mcr-1* gene (32).

In Latin America, the *E. coli* belonging to CC10 clonal complex, known as the largest human clonal complex, was the most reported in previous studies, including the ST744 and ST10 (1, 17, 22, 33). *E. coli* CC10 strains are widely disseminated among humans, animals, meat products, and environmental sources (34, 35) and are designated as multidrug-resistant strains carrying frequently ESBL, among others (5, 31).

The *mcr-1* gene is carried by a wide range of conjugative and non-conjugative plasmid types, including IncX3, IncX4, an

TABLE 1 | Summary of mainly studies reporting *mcr-1* gene in Latin America.

Period of the study	Country	Source of Isolate	Total Isolates (<i>mcr</i> -carried)	Species	Plasmid Type	Sequence Type (ST)	Genetic Context	References
2000–2016	Brazil	Fecal samples-chicken and swine (Production Animals)	515 (16)	<i>E. coli</i>	—	—	—	(15)
2002–2016	Colombia	Urine vaginal secretion blood stool tissue right toe leg secretion abdomen abscess (Human)	513 (12)	<i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> Typhimurium <i>K. pneumoniae</i>	IncP-1 IncFII IncHI1 IncH	<i>E. coli</i> (ST10, ST37, ST101, ST744, ST1263, ST3050, and ST6627) <i>S. Typhimurium</i> (ST34) <i>K. pneumoniae</i> (ST307)	ISApl1- <i>mcr-1</i> -pap2 (IncP-1) <i>mcr-1</i> -pap2 (IncP-1)	(17)
2008–2016	Argentina	Urine, blood, abdomen, abscess, bone (Human)	87 (3)	<i>E. coli</i>	—	—	—	(13)
2012	Argentina	Fecal samples - Kelp gulls penguin (Wild Animal)	50 (5)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST101 and ST744	ISApl1- <i>mcr-1</i>	(14)
2012–2018	Argentina	Urine, blood, other samples (Human)	192 (192)	<i>E. coli</i>	IncHI2 IncX4	ST10, ST156, ST354, ST8492, ST5208	—	(27)
2013	Bolivia	Potatoes (Food)	83 (1)	<i>C. braakii</i>	IncI2	—	—	(16)
2013	Argentina	Fecal samples-Chicken (Production Animals)	10 (10)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST155 (CC10; ST10, ST1141 and ST1280), ST617, ST10, ST410, ST1011, ST1408	ISApl1- <i>mcr-1.5</i> -pap2-ISApl1	(23)
2013–2014	Ecuador	Feces-chicken (Production Animals)	176 (6)	<i>E. coli</i>	—	—	—	(24)
2013–2016	Brazil	Meat Poultry (Food)	60 (2)	<i>Salmonella enterica</i> serovar Schwarzengrund	IncX4	ST96	<i>parA</i> and hypothetical protein upstream <i>mcr-1</i> and <i>pap2</i> downstream	(44)
2013–2017	Chile	Urine (Human)	13 (1)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST4204 (CC10)	<i>mcr-1</i> was delimited upstream by a gene that encodes a <i>pap2</i> protein and downstream by a <i>relaxase</i> -encoding gene (<i>nkfB</i>)	(19)
2014	Argentina	Clinical samples - dogs and cats (Pets)	54 (1)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST770	<i>mcr-1</i> was delimited upstream by <i>nkfB</i> gene which encodes a <i>relaxase</i> and <i>pap2</i> downstream	(31)
2014–2017	Brazil	Pork carcasses (Food)	490 (8)	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	IncX4	ST19 ST4586 ST50	<i>mcr-1</i> was delimited upstream by IS26 and hypothetical protein and <i>pap2</i> downstream	(26)
2015	Venezuela	Fecal samples (Human and Animal)	93 (2)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST452 and ST19	Absence of ISApl1	(22)
2015	Mexico	Swine stool samples (Production Animal)	1 (1)	<i>E. coli</i>	IncP0111	ST744	ISApl1 upstream <i>mcr-1</i> gene	(22)

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Period of the study	Country	Source of Isolate	Total Isolates (mcr-carried)	Species	Plasmid Type	Sequence Type (ST)	Genetic Context	References
2015–2016	Brazil	Rectal swab and urine (Human)	140 (2)	<i>E. coli</i>	IncX4	ST206 and ST354	<i>mcr-1</i> was delimited upstream by IS26 and hypothetical protein and <i>pap2</i> downstream	(16)
2016	Brazil	Seawater (Environment)	11 (3)	<i>E. coli</i>	IncX4	–	–	(36)
2016	Ecuador	Fecal swabs and soil fecal from chicken and two dogs (Domestic Animals)	42 (3)	<i>E. coli</i>	IncI2	ST3941, ST1630, ST2170	<i>mcr-1</i> was delimited upstream by <i>nikB</i> gene and <i>pap2</i> downstream	(32)
2016	Brazil	Rectal swab (Human)	3 (3)	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	IncX4	<i>E. coli</i> ST744 and <i>K. pneumoniae</i> ST101	–	(36)
2016	Bolivia	Fecal samples (Human)	337 (173)	<i>E. coli</i> , <i>C. europaeus</i> , <i>E. hamschei</i>	IncI2 and IncHI1 (<i>E. coli</i>), <i>Citrobacter</i> and <i>Enterobacter</i> (IncI2)	<i>E. coli</i> (ST49, ST744, ST10, ST206, ST2705, ST2936, ST1286, ST7,570, ST69, ST10, ST117, ST711, ST7571, ST3050)	<i>mcr-1-pap</i> (IncI2) <i>mcr-1-S-pap</i> ISApI' (IncHI1) ISApI'- <i>mcr-1-pap</i> -ISApI' (IncHI1)	(27)
2016–2017	Paraguay	Urine and feces (Human)	150 (7)	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , and <i>S. Schwarzengrund</i>	–	–	–	(20)
2017	Brazil	Water Sample from a mangrove (Environment)	1 (1)	<i>E. coli</i>	IncX4	–	–	(39)
2017	Uruguay	Blood, rectal swab, and urine (Human)	3 (3)	<i>E. coli</i>	IncI2 e IncX4	ST10, ST93, and ST5442	–	(19)
2017	Peru	Urine (Human)	10 (7)	<i>E. coli</i>	–	–	–	(21)
2019	Brazil	Fecal sample and Water from Zoo (Wild Animal and Environment)	27 (5)	–	–	–	–	(29)
2020	Brazil	Blood, urine, and peritoneal fluid (Human)	100 (2)	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	IncX4	ST471/ST410 (<i>E. coli</i>) and ST15 (<i>K. pneumoniae</i>)	–	(29)

– No data.

IncX3–X4 hybrid, IncHI1, IncHI1, IncHI2, IncP, IncI2, IncF, IncFII, an IncI2–IncFIB hybrid, and IncY (5). The *mcr-1* gene can also be integrated into the chromosome of some strains (17). However, in Latin America, only four plasmids have been described so far: IncX4 (36), IncP (22), IncI2 (31), and IncHI2 (37), of which the IncX4 plasmid is the most frequent in Brazil (38, 39) (Table 1). There is a clear association between the IncX4 plasmids and the insertion sequences associated with the dissemination of the *mcr-1* gene (40).

Plasmid analysis has revealed that the insertion sequence IS*Apl1* (which belongs to the IS30 family transposase), in a composite transposon (IS*Apl1*-*mcr-1*-IS*Apl1*), is usually present in IncHI2-type plasmids (size of 200 kb), being either present or absent in IncI2-type plasmids (60 kb), and completely absent in IncX4-type plasmids (30 kb) (Table 1).

The role of IS*Apl1* in the mobilization of the *mcr-1* gene was demonstrated *in vitro* by transposition. It was suggested that the recombination events associated with mobilization of the *mcr-1* gene were initially mediated by two copies of IS*Apl1* from an unknown progenitor to a plasmid and subsequently transferred to Enterobacteriales (41).

Besides that, according to Snestrud et al., the presence of a single or two copies of IS*Apl1* indicates a recent acquisition of the *mcr-1* gene, whereas the absence of this insertion sequence could be correlated with the adaptation of the *mcr-1* gene to a new host (41).

The regulation mechanism of *mcr-1* gene expression is complex and remains unknown. In general, the gene expression is controlled by its promoter and the corresponding activators and/or inhibitors. Zhang et al. suspect that genes encoding activators and/or inhibitors in the host chromosome may affect the expression of the *mcr-1* gene found on plasmids IncX4 and other plasmids. They may vary expressively in unlike genetic backgrounds of the different strains and/or *mcr-1*-harboring plasmids, despite that their promoters are remarkably similar (42).

Although the mobility and dissemination of the *mcr-1* gene are associated with IS*Apl1* and the *pap2* gene in most plasmid types (43), the genetic context of the IncX4 plasmid type, in Latin America, is different. This context is characterized by lacking the IS*Apl1*, but it preserves the *pap2* sequence and a hypothetical protein (hp) around the *mcr-1* gene (26, 44). What would be the explanation for that?

Snestrud et al. analyzed the genetic environment of the *mcr-1* gene associated or not with IS*Apl1* and concluded that the target site duplications generated by IS*Apl1* transposition are present even in lack of the IS*Apl1*. This result suggests that the mechanism to mobilize the *mcr-1* gene is the same as that observed in other plasmids, and after that, the loss of the insertion sequence by recombination events in IncX4 occurs (45).

Furthermore, the IS26 mobile element upstream to the *mcr-1* gene has been also associated with IncX4 plasmid types in Brazil, but there are no other reports in Latin America (26, 46) (Table 1). This Insertion Sequence (IS) plays an important role

in the dissemination and evolution of the antimicrobial resistance genes on plasmids, including colistin resistance genes (1).

DISCUSSION

In veterinary medicine, colistin is mainly administrated in pigs and poultry production, for prophylaxis or treatment. The spread of colistin resistance may lead to treatment failure, as well as increase the pathogen transmission reach with quality and economic loss in production animals.

Strong scientific evidence indicates that the *mcr-1* gene might have originated from animals because (i) colistin has been used extensively for decades in veterinary practices; (ii) *mcr-1* gene was largely identified in several animals and animal food products; (iii) the identification of the *mcr-1* gene in *E. coli* isolate recovered before 1980 in China suggests that the emergence of this gene may be linked to the use of colistin as a growth promoter in the poultry industry; and (iv) genetic features of *mcr-1* gene associated with IS*Apl1* were first identified in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a common animal pathogen (43), which could be involved in recombination events leading to the mobilization of the *mcr-1* cassette.

Finally, a recent study has demonstrated that when colistin is banned from use in animal feed, there was a significant decrease of the *mcr-1* gene prevalence in most sources, including pig farms, food, and environment samples (47). Given that the production animals can be a reservoir for *mcr-1* gene and its dissemination can occur by food and environment, all countries should apply surveillance, monitoring, and restrictive measures to polymyxins use. In Latin America, Brazil, and Argentina (1) have already banned the use of colistin as a growth promoter, but the impact of this measure has not been evaluated yet.

The problem of antimicrobial resistance is related to the use and abuse of antibiotics in humans, animals, and the environment. Besides that, the *mcr-1* gene is disseminated mainly by *E. coli* clones, with a high capacity to survive in different ecological niches, some of them with pandemic and epidemic potential. So, it seems clear that the One Health approach should be adopted to integrate veterinary and human medicine to address antimicrobial resistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SAML, TVD, and AFM: conception of the opinion, collected data, and wrote the paper. ALB and AFM: reviewed and edited. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by National Institute of Antimicrobial Resistance Research - INPRA (MCTI/CNPq/CAPES/FAPs nº 16/2014). SAML were supported by a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Anyanwu MU, Jaja IF, Nwobi OC. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (*Mcr*) gene-containing isolates from the environment: a review. *Int J Environ Res Public Health*. (2020) 17:1028. doi: 10.3390/ijerph17031028
- Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. (2014) 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643
- Kai J, Wang S. Recent progress on elucidating the molecular mechanism of plasmid-mediated colistin resistance and drug design. *Int Microbiol*. (2020) 23:355–66. doi: 10.1007/s10123-019-00112-1
- Li Z, Cao Y, Yi L, Liu J-H, Yang Q. Emergent polymyxin resistance: end of an Era? *Open Forum Infect Dis*. (2019) 6:ofz368. doi: 10.1093/ofid/ofz368
- Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. (2019) 51:93–100. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.001
- Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis*. (2016) 16:293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X
- Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. (2020) 9:508–16. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231
- Shen Y, Zhang R, Schwarz S, Wu C, Shen J, Walsh TR, et al. Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environ Microbiol*. (2020) 22:2469–84. doi: 10.1111/1462-2920.14961
- Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, Cacci IC, Iavarone AT, McGann P, et al. A novel plasmid-encoded *mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *J Antimicrob Chemother*. (2020) 75:60–4. doi: 10.1093/jac/dkz413
- Caselli E, D'Accolti M, Soffritti J, Fiffanelli M, Mazzacane S. Spread of *mcr-1*-driven colistin resistance on hospital surfaces, Italy. *Emerg Infect Dis*. (2018) 24:1752–3. doi: 10.3201/eid2409.171386
- Sherry N, Howden B. Emerging gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam—epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Rev Anti Infect Ther*. (2018) 16:289–306. doi: 10.1080/14787210.2018.1453807
- Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. (2019) 31:101459. doi: 10.1016/j.tmaid.2019.07.015
- Rapaport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, et al. First description of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. (2016) 60:4412–3. doi: 10.1128/AAC.00573-16
- Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J. The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *J Antimicrob Chemother*. (2016) 71:2335–6. doi: 10.1093/jac/dkw262
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance*. (2016) 21:30214. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214
- Sennati S, Di Pilato VD, Riccobono E, Maggio TD, Villagran AL, Pallecchi L, et al. *Citrobacter braakii* carrying plasmidborne *mcr-1* colistin resistance gene from ready-to-eat food from a market in the Chaco region of Bolivia. *J Antimicrob Chemother*. (2017) 72:2127–9. doi: 10.1093/jac/dkx078
- Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Arévalo SA, Reyes J, et al. Genomic and molecular characterization of clinical isolates of enterobacteriaceae harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother*. (2017) 61:e00841–17. doi: 10.1128/AAC.00841-17
- Gutiérrez C, Zenis J, Legarraga P, Cabrera-Pardo JR, Garcia P, Bello-Toledo H, et al. Genetic analysis of the first *mcr-1* positive *Escherichia coli* isolate collected from an outpatient in Chile. *Brazil J Infect Dis*. (2019) 23:203–6. doi: 10.1016/j.bjid.2019.05.008
- Papa-Ezdra R, Grill Diaz F, Vieytes M, Garcia-Fulgueiras V, Caiata L, Ávila P, Brasco M, et al. First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-1* in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. (2020) 20:187–90. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.016
- Melgarejo Touchet N, Martínez M, Franco R, Falcón M, Busignani S, Espinola C, et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae in Paraguay. *Rev Salud Publica Del Paraguay*. (2018) 8:44–8. doi: 10.18004/rsp.2018.junio.44-48
- Ugarte Silva RG, Olivo López JM, Corso A, Pasteran F, Albornoz E, Sahuayan Blácido ZP. Resistencia a colistin mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú. *An Fac Med*. (2018) 79:213. doi: 10.15381/anales.v79i3.15313
- Garza-Ramos U, Tamayo-Legorreta E, Arellano-Quintanilla DM, Rodríguez-Medina N, Silva-Sánchez J, Catalan-Najera J, et al. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistant *mcr-1*-producing *Escherichia coli* isolate from a swine farm in Mexico. *Genome Announc*. (2018) 6:e00102–18. doi: 10.1128/genomeA.00102-18
- Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadía-Patiño L, Gonzalez-Zorn B. Coexistence of *mcr-1* and blaNDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother*. (2016) 60:6356–8. doi: 10.1128/AAC.01319-16
- Vinueza-Burgos C, Ortega-Paredes D, Narváez C, De Zutter L, Zurita I. Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS ONE*. (2019) 14:e0207567. doi: 10.1371/journal.pone.0207567
- Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório Anual*. (2020). Available online at: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf (accessed November 20, 2020).
- Rau RB, De Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Barth AL. Salmonella enterica *mcr-1* positive from food in Brazil: detection and characterization. *Foodborne Pathog Dis*. (2020) 17:202–8. doi: 10.1089/tpd.2019.2700
- Giani T, Sennati S, Antonelli A, Di Pilato V, di Maggio T, Mantella A, et al. High prevalence of carriage of *mcr-1*-positive enteric bacteria among healthy children from rural communities in the Chaco region, Bolivia, september to october 2016. *Euro Surveill*. (2018) 23:1800115. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800115
- dos Santos LDR, Furlan JPR, Ramos MS, Gallo IFL, de Freitas LVP, Stehling EG. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7* and clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental and fecal samples. *Arch Microbiol*. (2020) 202:1795–800. doi: 10.1007/s00203-020-01890-3
- Rocha IV, dos Santos Silva N, das Neves Andrade CA, de Lacerda Vidal CF, Leal NC, Xavier DE. Diverse and emerging molecular mechanisms award polymyxins resistance to Enterobacteriaceae clinical isolates from a tertiary hospital of Recife, Brazil. *Infect Genet Evol*. (2020) 85:104584. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104584
- Faccone D, Martino F, Albornoz E, Gomez S, Corso A, Petroni A. Plasmid carrying *mcr-9* from an extensively drug-resistant NDM-1-producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* clinical isolate. *Infect Genet Evol*. (2020) 81:104273. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104273
- Rumi M V, Mas J, Elena A, Cerdeira L, Muñoz ME, Lincopan N, et al. Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. *Vet Microbiol*. (2019) 230:228–34. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.006
- Loayza-Villa F, Salinas L, Tijet N, Villavicencio F, Tamayo R, Salas S, et al. Diverse *Escherichia coli* lineages from domestic animals carrying colistin resistance gene *mcr-1* in an Ecuadorian household. *J Glob Antimicrob Resist*. (2020) 22:63–7. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.002
- Dominguez JE, Faccone D, Tijet N, Gomez S, Corso A, Fernández-Miyakawa ME, et al. Characterization of *Escherichia coli* carrying *mcr-1*-plasmids recovered from food animals from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol*. (2019) 9:41. doi: 10.3389/fcimb.2019.00041
- Manges AR, Harel J, Masson L, Edens TJ, Portt A, Reid-Smith RJ, et al. Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. *Foodborne Pathog Dis*. (2015) 12:302–10. doi: 10.1089/tpd.2014.1860
- Chen P-A, Hung C-H, Huang P-C, Chen J-R, Huang I-F, Chen W-L, et al. Characteristics of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from multiple rivers in Southern Taiwan. *Appl Environ Microbiol*. (2016) 82:1889–97. doi: 10.1128/AEM.03222-15
- Fernandes MR, Sellera FP, Esposito F, Sabino CP, Cerdeira L, Lincopan N. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. *Antimicrob Agents Chemother*. (2017) 61:e00234–17. doi: 10.1128/AAC.00234-17

37. Faccone D, Rapoport M, Albornoz E, Celaya F, De Mendieta J, De Belder D, et al. Plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: a retrospective study, 2012–2018. *Rev Panam Salud Pub.* (2020) 44:e55. doi: 10.26633/RPSP.2020.55
38. Perdigão Neto LV, Corscadden L, Martins RCR, Nagano DS, Cunha MPV, Neves PR, et al. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. *Infection.* (2019) 47:661–4. doi: 10.1007/s15010-019-01309-2
39. Sacramento AG, Fernandes MR, Sellera FP, Muñoz ME, Vivas R, Dolabella SS, et al. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* (2018) 15:288–9. doi: 10.1016/j.jgar.2018.10.024
40. Sun J, Fang L-X, Wu Z, Deng H, Yang R-S, Li X-P, et al. Genetic analysis of the IncX4 plasmids: implications for a unique pattern in the *mcr-1* acquisition. *Sci Rep.* (2017) 7:424. doi: 10.1038/s41598-017-00095-x
41. Snesrud E, He S, Chandler M, Dekker JP, Hickman AB, McGann P, et al. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*ApI1*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2016) 60:6973–6. doi: 10.1128/AAC.01457-16
42. Zhang H, Miao M, Yan J, Wang M, Tang Y-W, Kreiswirth BN, et al. Expression characteristics of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene. *Oncotarget.* (2017) 8:107596–602. doi: 10.18632/oncotarget.22538
43. Poirer L, Kieffer N, Nordmann P. *In vitro* study of IS*ApI1*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2017) 61:e00127–17. doi: 10.1128/AAC.00127-17
44. Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, de Oliveira CH, Peres BP, Silva APS, et al. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2019) 93:376–9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.016
45. Snesrud E, McGann P, Chandler M. The birth and demise of the IS*ApI1*-*mcr-1*-IS*ApI1* composite transposon: the vehicle for transferable colistin resistance. *MBio.* (2018) 9:e02381–17. doi: 10.1128/mBio.02381-17
46. Zamparette CB, Schorner M, Campos E, Moura Q, Cerdeira L, Tartari DC, et al. IncX4 plasmid-mediated *mcr-1.1* in polymyxin-resistant *Escherichia coli* from outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. *Microb Drug Resist.* (2020) 26:1326–33. doi: 10.1089/mdr.2019.0203
47. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis.* (2020) 20:1161–71. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30149-3

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Lentz, Dalmolin, Barth and Martins. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO PROJETO DOUTORADO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

PARECER de PROJETO DE DOUTORADO

O projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização de genes de resistência de isolados de *E. coli* provenientes de suínos, avaliação dos diferentes perfis clonais circulantes e sua relação com resíduos de antimicrobianos no ambiente e na carne *in natura***" sob a responsabilidade da Professora Dra. **Andreza Martins**, vinculado ao Doutorado da aluna **Silvia Adriana Mayer Lentz**, no **Programa de Pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente** apresenta:

Um tema relevante e com mérito científico uma vez que propõe como principais objetivos determinar a prevalência de genes de resistência em isolados de *E. coli* obtidos de suínos, ambiente e trabalhadores relacionados à suinocultura, comparar os perfis clonais encontrados com os circulantes já conhecidos e caracterizados na literatura, bem como correlacionar com os resíduos de antimicrobianos encontrados na carne *in natura* e ambiente.

A professora **Dra. Andreza Martins**, coordenadora do projeto, apresenta qualificação adequada, a julgar pelo seu currículo, demonstrando produtividade científica e experiência na área proposta e na formação de recursos humanos.

Sendo assim, a comissão de seleção de Doutorado 2017/01 foram de **parecer favorável à aprovação** do presente projeto.

Porto Alegre, 13 de junho de 2017.


Profª Drª Marisa da Costa
Coordenadora do PPG Microbiologia
Agrícola e do Ambiente/UFRGS

Profa. Marisa da Costa
Coordenadora do PPGMAA

ANEXO 2 – E-MAIL CONTENDO A APROVAÇÃO DO PROJETO CEUA – UFRGS



Silvia Lentz <silvia82drica@gmail.com>

Fwd: Projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais

1 mensagem

Andreza Martins <andrezafr20@gmail.com>
 Para: Silvia Lentz <silvia82drica@gmail.com>

23 de março de 2018 15:42

Aprovado!!

----- Forwarded message -----

From: <ceua@propesq.ufrgs.br>
 Date: sex, 23 de mar de 2018 às 15:14
 Subject: Projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais
 To: <andrezafr20@gmail.com>

boxbe ceua@propesq.ufrgs.br is not on your Guest List | Approve sender | Approve domain

Prezado Pesquisador ANDREZA FRANCISCO MARTINS,

Informamos que o projeto de pesquisa CARACTERIZACAO DE GENES DE RESISTENCIA DE ISOLADOS DE E. COLI PROVENIENTES DE SUINOS, AVALIACAO DOS DIFERENTES PERFIS CLONAIIS CIRCULANTES E SUA RELACAO COM RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS NO AMBIENTE E NA CA, encaminhado para análise em 27/06/2017, foi aprovado no(a) Comissão de Ética no Uso de Animais com o seguinte parecer:

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o projeto em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 384 suínos em crescimento, provenientes de diversas granjas do Rio Grande do Sul, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais

--

Dra. Andreza Francisco Martins

*Professor Adjunto | - UFRGS
 Coordenadora do Curso de Especialização em Microbiologia Clínica
 Instituto de Ciências Básicas da Saúde
 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
 Pesquisadora INPRA - Inst. Nac. Pesq. Resistência Antimicrobiana
 Secretária Científica ABIH 2017-2018
 Fone: (51) 33083422*

ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE E. coli PROVENIENTES DE SUINOS, AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PERFS CLONAIIS CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE E NA CARNE IN NATURA

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 90762818.9.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.802.908

Apresentação do Projeto:

O projeto "Caracterização de genes de resistência de isolados de E. coli provenientes de suínos, avaliação dos diferentes perfis clonais circulantes e sua relação com resíduos de antibióticos no ambiente e na carne in natura" tem por objetivo determinar a prevalência de genes de resistência em isolados de E. coli obtidos de suínos, do ambiente e de trabalhadores relacionados à suinocultura. E, correlacionar a presença de genes de resistência encontrados nos isolados humanos, em animais e no ambiente com os resíduos de antimicrobianos presentes nas amostras de carne in natura, ração e amostras ambientais e desta maneira estabelecer o ciclo de propagação destes genes.

A coleta das amostras ocorrerá em granjas existentes no Rio Grande do Sul, em parceria com os Serviços de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal/DIPOA - Serviço de Inspeção Estadual-RS, na véspera do abate de cada lote amostrado. As coletas incluirão amostras de: swab retal de suínos, água potável, swab de arraste da pocilga, ração, swab das mãos dos trabalhadores. As análises microbiológicas serão realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (323) do ICBS, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) e também no LANAGRO/RS (Laboratório de Referência do MAPA). Serão coletados 6 animais por lote, com o objetivo de coletar

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.802.908

entre 46 e 64 lotes, sendo estimado um tamanho médio de lote de 600 animais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Determinar a prevalência de genes de resistência em isolados de *E. coli* obtidos de suínos, ambiente e trabalhadores relacionados a suinocultura, comparar os perfis clonais encontrados com os circulantes já conhecidos e caracterizados na literatura bem como correlacionar com os resíduos de antimicrobianos encontrados na carne in natura e no ambiente.

Objetivos Secundários

1. Determinar a prevalência dos genes blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaKPC, blaGES, blaOXA-48, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, qnrA, qnrB, qnrS e mcr-1 em isolados de *E. coli*;
2. Avaliar o consumo de antimicrobianos associado ao consumo de ração dos animais amostrados, durante o período pré-abate;
3. Relacionar o consumo de antimicrobianos com a presença de genes de resistência;
4. Estabelecer a relação entre as STs de *E. coli* resistentes obtidas dos animais com as já descritas na literatura;
5. Propor uma rota de disseminação dos genes de resistência a partir dos dados obtidos com o MLST.
6. Avaliar a ocorrência de antimicrobianos relacionados a esses genes de resistência (-lactâmicos, fluorquinolonas e polimixinas) utilizando LC-MS/MS, em amostras de alimentos provenientes dos animais em estudo, e ambientais, originadas na produção e abate destes animais.

Metas

7. Apresentar 5 resumos em congressos científicos;
8. Publicar 3 artigos científicos;
9. Concluir a tese em até 48 meses.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo, relacionado ao desconforto na coleta do suabe de mãos. Podendo o participante desistir da coleta a qualquer tempo.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.802.908

Benefícios:

Sem benefícios diretos, porém indiretamente os pesquisadores estarão contribuindo para a geração do conhecimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A resistência antimicrobiana em bactérias se tornou um importante problema de saúde pública. A recente identificação do gene mcr-1, que confere resistência às polimixinas, última opção terapêutica para tratar infecções multirresistentes causadas por bactérias da família Enterobacteriaceae, trouxe preocupação. Agentes antimicrobianos são indispensáveis no controle de infecções bacterianas, não só em seres humanos, como também em animais e plantas. A utilização sistemática de um antimicrobiano seleciona bactérias com concentrações inibitórias mínimas mais elevadas e sob a pressão seletiva imposta pelo seu uso, algumas cepas que possuem mecanismos de resistência podem multiplicar-se e expandir-se em detrimento de outras que são inibidas pelo respectivo agente. Diversos esforços têm sido realizados para demonstrar a ligação existente entre o consumo de antimicrobianos na alimentação animal e a presença de genes de resistência no ambiente. O uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento animal e a falta de programas eficientes de vigilância por parte dos órgãos de saúde pública é um grande obstáculo na prevenção da disseminação da resistência microbiana. Outra possibilidade é que não é improvável que bactérias resistentes em animais sejam originadas de fontes humanas. A pecuária e seus arredores são expostos a microrganismos resistentes selecionados pelo uso prudente, exaustivo ou mesmo errado de antimicrobianos na medicina humana. Veterinários e membros das equipes das fazendas, são expostos a organismos presentes em resíduos hospitalares e tornam-se fontes resistentes ligando humano e animal na microbiologia, através da troca de clones ou entidades genéticas. Muitas teorias e controvérsias existem a respeito da disseminação de genes de resistência entre animais e humanos, no entanto, a prevalência destes genes em bactérias zoonóticas comensais ou de animais é pouco conhecida. A partir disso, torna-se necessária uma intensificação da vigilância sobre a ocorrência de bactérias carreando genes de resistência na cadeia alimentar e de outras fontes de origem animal, a fim de conhecer melhor o potencial reservatório ambiental destes genes e contribuir para a formulação de medidas que busquem reduzir a sua propagação potencial. Este projeto pretende avaliar os principais genes de resistência de importância clínica (blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaKPC, blaGES, blaOXA-48, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, qnrA, qnrB, qnrS e mcr-1) em isolados de E. coli obtidos de suínos, de amostras ambientais e de suabes de trabalhadores relacionados a cadeia

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.802.908

suinocultura, bem como a ocorrência de antimicrobianos relacionados a estes genes em amostras de alimentos e ambientais. Por tratar-se do principal microrganismo presente na microbiota humana e animal e com elevado potencial para a disseminação de genes de resistência, a *E. coli* foi escolhida. Além disso, pretendemos estabelecer a correlação existente entre a presença destes genes nos animais, no ambiente e em humanos e o uso profilático e/ou terapêutico de antimicrobianos na cadeia produtiva, correlacionando-os com os resíduos de antimicrobianos encontrados na carne in natura e ambiente e propor uma teoria sobre a circulação de clones de *E. coli* entre diferentes ambientes, a partir dos resultados obtidos com o MLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto inclui referencial teórico, justificativa, objetivos, descrição da metodologia, descrição dos riscos e benefícios do estudo, breve descrição da análise estatística, cálculo do tamanho amostral dos animais, referências bibliográficas e cronograma de atividades. Apresentam o Formulário de Delegação de Funções, o TCLE Humano para obtenção de amostras humanas e o TCLE Uso de Animais. Apresentam também a Aprovação da CEUA UFRGS (março/2018) e do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente: Instituto de Ciências Básicas da Saúde (aprovação projeto de doutorado – junho/2017).

Com relação às amostras ambientais, considerando que cada granja será considerada como um lote, serão 46 granjas, 02 suabes de bebedouros dos animais de cada granja, 1 amostra de esterqueira de cada granja, 01 amostra de água (200ml) para análise microbiológica de cada granja, 02 suabes de arraste – pocilga por granja, 01 suabe de mão de todos os manipuladores de cada granja que consentirem com a coleta; visando a análise de resíduos de antimicrobianos: 01 amostra de 100g de ração de cada granja, 1L de água de cada granja e 01 amostra de músculo de 100g de cada lote, pós abate – coletada no abatedouro frigorífico.

Recomendações:

- * Apesar de os pesquisadores já terem inserido o TCLE para uso dos animais assinado pela Cooperativa Languiru Ltda, quando da visita em cada granja deverá ser verificada a necessidade de consentimento local;
- * Sugere-se incluir justificativa para os tamanhos amostrais determinados e verificar/justificar a necessidade de cálculo de tamanho de amostra para que a mesma seja representativa;
- * Sugere-se incluir os esclarecimentos da carta de respostas de como os dados serão analisados considerando todos os objetivos propostos, na Metodologia do projeto apresentado;

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.802.908

* Reiteramos a sugestão de incluir bibliografias mais recentes, as quais poderão auxiliar no desenvolvimento do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.739.259 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 17/07/2018. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão de 17/07/2018, TCLE versão de 12/05/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 46 participantes, de acordo com as informações do projeto. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.802.908

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1103803.pdf	17/07/2018 20:19:16		Aceito
Outros	CartadeCorrecaoCEP.docx	17/07/2018 20:18:40	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradoFinalCEUA17072018.doc	17/07/2018 19:52:32	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Outros	TCLEAnimalDoutoradoLanguiru2018.pdf	03/07/2018 17:30:49	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Outros	Formdelegfun.jpg	02/06/2018 16:54:29	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEUA1.JPG	12/05/2018 22:17:40	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEUA.JPG	12/05/2018 22:17:27	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclehumano.doc	12/05/2018 22:11:09	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Parecer Anterior	parecerprojetodoutorado.pdf	12/05/2018 22:08:54	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoassinadaAfonso.pdf	12/05/2018 22:06:32	SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 06 de Agosto de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

ANEXO 4 – CARTA DE APROVAÇÃO PROJETO HCPA**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE****Grupo de Pesquisa e Pós Graduação****Carta de Aprovação****Projeto**

2018/0672

Pesquisadores:**AFONSO LUIS BARTH**

SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ

DAIANA DE LIMA MORALES

ANDREZA FRANCISCO MARTINS

Número de Participantes: 0**Título:** CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE E. coli PROVENIENTES DE SUINOS, AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PERFIS CLONAIIS CIRCULANTES E SUA RELAÇÃO COM RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE E NA CARNE IN NATURA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).