

Detecção de isolados *Escherichia coli* multirresistentes e genotipicamente relacionados em fezes e carcaças suínas

Detection of Genotypically Related Multi-resistant *Escherichia coli* Isolates in Pig Feces and Carcasses

Caroline Pissetti^{1§}, Gabriela Orosco Werlang^{1‡}, Jalusa Deon Kich² & Marisa Cardoso¹

ABSTRACT

Background: Antimicrobial resistant bacteria are considered a hazard not only for the treatment of animal diseases but also for public health. Commensal bacteria, such as *Escherichia coli* are considered a good indicator of antimicrobial resistance in the population, because it is a gut inhabitant and thus undergoes constant pressure of selection by the administration of antimicrobials. Regarding the public health, it is important to evaluate if resistant bacteria carried in the intestinal content of slaughter pigs can be found on the surface of pre chill carcasses. Therefore, the aims of this study were to evaluate the frequency of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from feces and pig carcasses; and to assess if multi-resistant isolates from both sources were phenotypically and genotypically related.

Materials, Methods & Results: Two sampling cycles were conducted in three pig slaughterhouses (A, B and C). In each cycle, samples were collected from: *i.* feces deposited on the pen floor of the lairage; *ii.* surface of carcasses at the pre-chill step. Samples were submitted to a protocol of isolation and confirmation of *Escherichia coli*. Isolates were grouped according to the origin: feces (n = 355); carcasses (n = 319); and evaluated for antimicrobial resistance by agar diffusion test. Ninety two isolates presenting multidrug resistance profile were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Among the 674 isolates of *E. coli*, 7.4% were susceptible to all tested antibiotics while 79.5% (536/674) were multi-resistant. The most frequent resistance patterns were displayed to tetracycline (Tet, 85.9%), ampicillin (Amp, 73.0%), sulfonamide (Sul, 70.0%), florfenicol (Flo, 65.0%) and nalidixic acid (Nal, 58.9%). The most frequent multi-resistance profile among isolates from both origins was [AmpFloNalSulTet]. Multiresistant isolates originated from feces and carcasses displaying genotypically related pulsotypes ($\geq 70\%$ similarity) were found in all three slaughterhouses.

Discussion: In agreement with other studies, *E. coli* isolated from pig feces and carcasses demonstrated a high frequency of antimicrobial resistance and multi-resistance. The most frequent resistance profiles included antimicrobials frequently used on farm as well as drugs that have been banned as feed additives some years ago in Brazil. The selection of resistant strains may be related to the selection pressure due to the use of antimicrobials in the pig production chain as well as the co-selection of resistance mediated by genes located in common genetic elements. Therefore, the ban of an individual drug is not always associated with the immediate disappearance of the resistance phenotype in the bacteria population. The fact that most multi-resistant *E. coli* isolates from carcasses belonged to pulsotypes related to those originated from feces samples indicates that resistant *E. coli* isolates selected on farm may be able to survive the slaughter process and be found on the carcass. In this case, the possibility of those strains being able to reach the population through the consumption of pork products may have to be considered. This hazard has motivated the ban of antimicrobial use in animals in some countries. However, the ban of antimicrobials use on farm is a controversial issue, due to the economical losses that may result from this measure. Therefore, the prudent use of antimicrobials on farm should be encouraged and its influence in the multi-resistance profile of the enteric microbiota should be further studied.

Keywords: *Escherichia coli*, swine, pork, antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

Bactérias resistentes a antimicrobianos representam um risco, não apenas para a saúde animal, como também para a saúde pública, uma vez que podem ser transmitidas aos humanos como contaminantes de alimentos [7]. O *Codex Alimentarius* reconhece que a resistência antimicrobiana, tanto em bactérias patogênicas quanto em comensais, é um dos principais problemas de saúde pública global e uma questão de segurança dos alimentos [14]. Nesse sentido, há evidências que bactérias isoladas de humanos podem apresentar perfil de resistência antimicrobiana e genótipos semelhantes às aquelas encontradas em animais [19,37].

As bactérias comensais, como *Escherichia coli*, são consideradas um bom indicador do padrão de resistência de uma população microbiana, uma vez que, por habitarem o intestino, estão submetidas à constante pressão de seleção resultante da administração de antimicrobianos [4,26]. Além disso, um determinado número de bactérias comensais pode estar presente nos produtos de origem animal, sem que o mesmo seja considerado impróprio para o consumo [1]. Sendo assim, avaliar a possibilidade de bactérias comensais multirresistentes sobreviverem ao processo de abate de suínos e de permanecerem na superfície da carcaça, pode contribuir para compreender o risco para saúde humana representado pelo uso de antimicrobianos nos animais. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram: avaliar a frequência de resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* originados de fezes e de carcaças suínas; e, verificar se isolados multirresistentes de ambas as origens eram fenotipicamente e genotipicamente relacionados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental e obtenção de amostras

O estudo foi conduzido em três matadouros-frigoríficos localizados no Estado de Santa Catarina. Dois ciclos de amostragens foram realizados em cada estabelecimento, acompanhando um turno de atividade, período em que foram abatidos entre 1.500 e 2.000 suínos. Em cada ciclo, três lotes de abate provenientes de granjas distintas foram amostrados. De cada lote foram colhidas duas amostras: *i.* fezes dos animais

alojados nas pocilgas de espera; *ii.* suabes de superfície de carcaças na etapa de pré-resfriamento.

Para colheita de fezes, o operador calçava, em ambos os pés, bota de plástico descartável e propé. A seguir, caminhava em várias direções da pocilga de espera, colocando em contato o propé com as fezes depositadas no piso. Em cada ciclo de amostragem, nos três matadouros-frigoríficos, foram colhidas fezes de animais alojados em três pocilgas de espera distintas, totalizando 18 amostras. Após a colheita, os propés foram acondicionados em sacos estéreis com 40 mL água peptonada¹ 0,1%, e a bota plástica descartada.

Foram amostradas 14 carcaças provenientes de suínos alojados em cada pocilga de espera, iniciando pela quinta carcaça da ordem na nória, sendo que as demais foram amostradas em intervalos de 20 carcaças. A colheita da amostra foi realizada por meio de esponjas² individuais estéreis, previamente umedecidas em 10 mL de água peptonada¹ 0,1% estéril. Esponjas foram friccionadas em quatro diferentes áreas de 100 cm² (lombo, papada, barriga e pernil), delimitada por molde estéril, totalizando 400 cm² de área amostrada por carcaça, de acordo com a Circular nº 130/2007/CGPE/DIPOA [28]. A seguir, as quatro esponjas colhidas foram acondicionadas, em um único saco plástico, constituindo a amostra que representava a carcaça, e mantida sob refrigeração até a análise.

Isolamento de Escherichia coli

As amostras de fezes e os suabes de carcaça foram adicionadas de 40 mL de água peptonada tamponada (APT1) 0,1% estéril e homogeneizadas³. Alíquotas das amostras foram semeadas em ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA¹) e incubadas (35°C ± 2; 24 h). Cinco colônias típicas de coliformes foram transferidas, individualmente, para ágar MacConkey e submetidas aos testes confirmatórios para *Escherichia coli* [32]. Após confirmação, foram formados dois grupos de isolados de *E. coli*: *i.* originados de fezes (n = 355); *ii.* originados de carcaça (n = 319). Em cada um dos grupos, foi garantido que isolados provenientes dos três matadouros-frigoríficos fossem incluídos em proporções semelhantes. Os grupos de isolados foram mantidos em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BH11) acrescidos de 20% de glicerol e congelados à -20°C até as análises.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados foram avaliados quanto à resistência aos antimicrobianos, pelo teste de difusão em ágar Muller-Hinton¹, realizado e interpretado de acordo com as normas dos documentos M31-A3 e M100-S22 [12,13]. A cepa *E. coli* ATCC#25922 foi utilizada como controle da qualidade do teste. Foram testados os seguintes antimicrobianos¹: ácido nalidíxico (Nal; 30 µg); ampicilina (Amp; 10 µg); cefotaxima (Cef; 30 µg); ceftazidima (Cft; 30 µg); gentamicina (Gen; 10 µg); florfenicol (Flo; 30 µg); sulfonamidas (Sul; 30 µg); tetraciclina (Tet; 30 µg). As frequências de resistência aos antimicrobianos foram comparadas através do teste não-paramétrico qui-quadrado (χ^2) pelo programa estatístico SPSS⁴ versão 23.0.0.2, com nível de confiança de 95%. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram fenótipo de resistência à no mínimo três antimicrobianos de classes distintas [34].

Macro restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Foram selecionados 92 isolados que apresentaram os cinco perfis mais frequentes de multirresistência, tanto de fezes quanto de carcaças. Os isolados selecionados foram submetidos à análise de macro restrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado - *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). A técnica foi conduzida de acordo com o protocolo recomendado pelo PulseNet [10], utilizando a enzima de restrição XbaI⁵. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% utilizando tampão 0,5X Tris-borato-EDTA no sistema CHEF DR-II⁶. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio⁷ (2µg/mL), fotografado em transiluminador e a imagem capturada e digitalizada pelo sistema Kodak Gel Logic 2200⁸. Os pulsotipos foram analisados pelo coeficiente de similaridade de Dice, com 1,7% de otimização e tolerância. Os perfis foram agrupados por UPGMA para construção de dendrogramas no software GelCompar II⁹. Isolados apresentando pulsotipos com similaridade $\geq 70\%$ foram considerados como grupos relacionados geneticamente.

RESULTADOS

Entre os 674 isolados de *E. coli* testados, 7,4% foram susceptíveis a todos os antimicrobia-

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

Do total de isolados de *E. coli*, 79,5% (536/674) foram classificados como multirresistentes. Entre os matadouros-frigoríficos (A, B, C) houve diferença significativa ($P = 0,006$) entre as frequências de isolados multirresistentes, que representaram 86,6% (194/224), 75,8% (185/244) e 76,2% (157/206), respectivamente. No total, foram encontrados 33 perfis multirresistentes distintos, sendo o mais frequente nos dois grupos de isolados e em todos os matadouros-frigoríficos [AmpFloNalSulTet] seguido de [AmpFloSulTet] (Tabela 2).

A análise de macro restrição (PFGE), conduzida em isolados apresentando perfis de multirresistência mais prevalentes, demonstrou que isolados de fezes e carcaças eram, na maioria dos casos, relacionados (similaridade $\geq 70\%$) nos três matadouros-frigoríficos. No matadouro A, dois grupos de isolados relacionados foram formados, incluindo de três até oito isolados com perfis de resistência comuns e de ambas as origens. Com exceção de dois isolados, todos os demais obtidos no estabelecimento B foram agrupados em um *cluster* relacionado, o qual apresentou predominantemente o perfil [AmpFloNalSulTet]. Em C, houve maior diversidade de pulsotipos, sendo formados dois grupos que incluíam entre 8 e 9 isolados; e seis pulsotipos não relacionados representados por isolados únicos ou duplos (Figura 1 A, B, C).

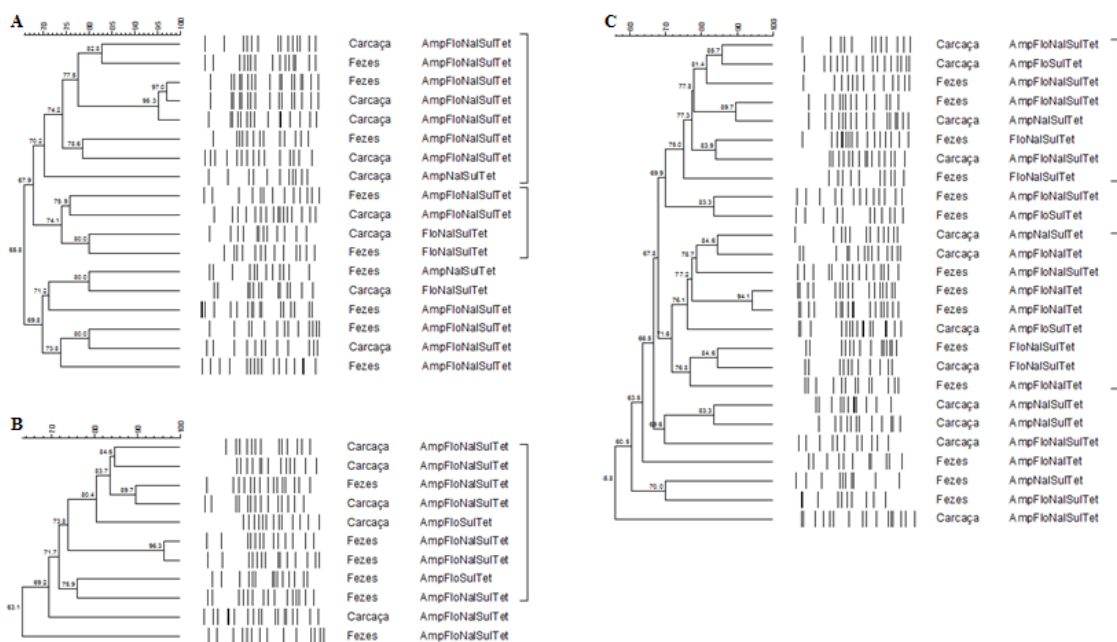


Figura 1. Perfis de macro restrição e de multirresistência de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos. Os grupos de isolados relacionados (similaridade $\geq 70\%$) estão marcados com colchetes. Amp: ampicilina; Flo: florfenicol; Nal: ácido nalidíxico; Sul: sulfonamida; Tet: tetraciclina.

Tabela 1. Frequência de isolados de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos em fezes e carcaças suínas em três matadouros frigoríficos localizados no estado de Santa Catarina, Brasil.

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

n: número de isolados.

Tabela 2. Perfis de multirresistência antimicrobiana mais frequentes em isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes e carcaças em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de suínos localizados no estado de Santa Catarina, Brasil.

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

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

DISCUSSÃO

A quase totalidade (92,6%) dos isolados de *E. coli* analisados apresentou fenótipo de resistência frente a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As maiores frequências de resistência foram encontradas frente à tetraciclina, ampicilina, sulfonamida, florfenicol e ácido nalidíxico, o que pode ser explicado pela pressão de seleção exercida pelo uso frequente desses antimicrobianos e pela co-seleção de resistências mediadas por genes localizados em elementos genéticos comuns [9,11,36].

Elevadas frequências de resistência aos antimicrobianos em bactérias provenientes de animais de produção já foram relatados em outros estudos [23,36], inclusive com perfil de resistência semelhante ao encontrado em isolados humanos [7,11,19,25,35,37]. Variações no protocolo de administração de antimicrobianos entre regiões e agroindústrias são comuns, influenciando na seleção de isolados [9,11,19,36], e justificando as diferenças de perfis de resistência encontradas na microbiota patogênica e comensal. Em alguns casos, como penicilinas, tetraciclinas e sulfonamidas, o uso como aditivos alimentares e/ou promotores de crescimento foi proibido há quase duas décadas no Brasil [29]. Entretanto, o uso terapêutico é permitido, contribuindo para continuidade da pressão seletiva [6]. Todas as classes de antimicrobianos mencionadas são prescritas na medicina humana para o tratamento de infecções urinárias, entéricas e respiratórias, inclusive aquelas causadas por *E. coli* [22]. Dos antimicrobianos testados, apenas o florfenicol não é utilizado na terapêutica humana, sendo a única molécula do grupo dos fenicóis que tem permissão para uso em programas preventivos e terapêuticos em suinocultura no Brasil [6]. Entretanto, a resistência ao florfenicol em Gram-negativas é codificada pelo gene *floR*, o qual confere resistência cruzada ao cloranfenicol [17], droga ainda adotada no tratamento de algumas infecções humanas. Por tudo isso, a circulação e seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos na produção animal e sua liberação no meio ambiente têm justificado as restrições ao uso de antimicrobianos [20].

Particularmente, a entrada de bactérias resistentes aos antimicrobianos na cadeia de produção de alimentos tem merecido destaque nessa discussão, principalmente no que diz respeito à capacidade desses isolados de ultrapassar as barreiras representadas pelo processamento de produtos de origem animal e chegar

ao consumidor. No presente estudo, a frequência de isolados resistentes frente à ampicilina, florfenicol, sulfonamida e tetraciclina foi significativamente maior no grupo de isolados de fezes do que de carcaças. Outros levantamentos de perfil de resistência [20,35] também relataram frequências menores de isolados de *E. coli* resistentes a alguns antimicrobianos em carne suína do que em fezes de suínos. Porém, diferenças na origem e época de coleta de cada tipo de amostra analisada podem ter influenciado nas frequências encontradas, dificultando a sua comparação. Alguns estudos sugerem que, ao longo do processo de abate, poderia ocorrer a substituição da microbiota original por isolados menos resistentes, os quais estariam presentes no ambiente do matadouro ou no intestino de suínos submetidos à menor pressão de uso de antimicrobianos [5,38]. Uma das hipóteses para explicar esse fato estaria relacionada à menor capacidade competitiva de isolados que carregam mutações e genes de resistência, quando na ausência da pressão seletiva dos antimicrobianos. Essa perda competitiva seria motivada pelo custo biológico de carrear esses genes suplementares [15,30]. Porém, outros estudos demonstraram que o impacto na eficiência metabólica de isolados carreando genes de resistência é muito baixo, não influenciando na sobrevivência de isolados resistentes, inclusive no ambiente de abate [16,18,21].

A análise de PFGE conduzida em isolados multirresistentes evidenciou que a maioria dos isolados originados de carcaça, em nosso estudo, era relacionada com aqueles de fezes colhidas na espera pré-abate. Nos três matadouros-frigoríficos (A, B, C), a maioria dos isolados com perfil de multirresistência foi agrupada em um a dois grandes clusters com similaridade $\geq 70\%$, os quais incluíram isolados de fezes e carcaças. Estudos demonstram que há grande diversidade de pulsotipos em *E. coli*, e isolados de pulsotipos similares podem surgir de forma independente em diferentes áreas geográficas [25,35]. Entretanto, os isolados analisados nesse estudo, por serem epidemiologicamente relacionados e apresentarem o mesmo perfil de multirresistência, demonstraram que isolados multirresistentes carregados no trato intestinal dos suínos podem ser encontrados em carcaças. A contaminação das carcaças com a microbiota intestinal pode ocorrer durante o abate, sendo possível, porém, reduzir o número de bactérias até níveis considerados higienicamente aceitáveis. Dessa forma, existe a possibilidade de um

baixo número de bactérias multirresistentes, presentes no conteúdo intestinal, entrar na cadeia de elaboração de alimentos e chegar até o consumidor.

Os perfis fenotípicos de multirresistência mais prevalentes entre os isolados de *E. coli* de ambas as origens apresentaram co-resistência à tetraciclina, ampicilina e sulfonamidas, sugerindo que os genes de resistências podem estar em cassetes gênicos localizados em elementos móveis comuns [2,23,29]. Como consequência, o uso terapêutico de qualquer uma das drogas mencionadas exercerá pressão seletiva sobre todo o cassete gênico, garantindo a manutenção do perfil de multirresistência na população bacteriana. Como componente suplementar do perfil de multirresistência mais prevalente [AmpFloNalSulTet], encontrou-se a resistência ao florfenicol e ao ácido nalidíxico. Esse último está, geralmente, relacionado a mutações cromossômicas independentes da presença de elementos genéticos móveis [33], porém o gene *floR*, que confere resistência aos fenicóis, encontra-se em plasmídeos passíveis de transferência por conjugação bacteriana [17]. A infecção humana é a principal preocupação no que diz respeito à ingestão de alimentos contaminados com bactérias multirresistentes, as quais poderiam colonizar, multiplicar e transferir elementos genéticos móveis no trato gastrointestinal dos consumidores, alterando o perfil de resistência da microbiota intestinal [24]. Como exemplo disso, há estudos demonstrando que indivíduos que trabalham em contato com aves ou suínos nas granjas e em matadouros-frigoríficos apresentam maior chance de serem colonizados por cepas comensais de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos [3,31].

É reconhecido que o uso de antimicrobianos na produção animal gera uma pressão seletiva, resultando em cepas multirresistentes que contribuem para a propagação desses genes no ambiente e na cadeia de produção de alimentos [9,11,19]. Porém, o abandono

do uso de antimicrobianos é assunto controverso, principalmente pelo fato de levar a perdas produtivas e econômicas [8]. Por outro lado, a percepção do consumidor em vários países parece ser favorável ao não-uso de antimicrobianos [27]. Portanto, é importante que mais estudos sejam conduzidos, no sentido de elucidar o reflexo do uso prudente de antimicrobianos em animais sobre os perfis de multirresistência da microbiota comensal.

CONCLUSÕES

Isolados comensais de *E. coli* provenientes de suínos apresentam frequência elevada de resistência e multirresistência frente aos antimicrobianos. Isolados multirresistentes originados de carcaça e de fezes colhidas durante a espera pré-abate podem pertencer a grupos genotípicos relacionados. Esse fato indica que isolados multirresistentes que ingressam no ambiente de abate, carregados no trato intestinal dos suínos, podem chegar até as carcaças, potencialmente ingressando no processo de elaboração de alimentos.

MANUFACTURERS

¹Oxoid Microbiology Products. Hampshire, UK.

²Whirl-Pak Laboratory Sampling Products. Fort Atkinson, WI, USA.

³LogenScientific. São Paulo, SP, Brazil.

⁴IBM Corporation. Armonk, NY, USA.

⁵Promega Corporation. Madison, WI, USA.

⁶Bio-Rad. Hercules, CA, USA.

⁷Sigma. St. Louis, MO, USA.

⁸KODAC. Rochester, NY, USA.

⁹Applied Maths. Kortrijk, Belgium.

Funding. O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Projeto Universal número 472159/2012-7).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2001.** RDC nº 12. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Available at <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. [Accessed November 2015].
- 2 **Ajiboye R.M., Solberg O.D., Lee B.M., Raphael E., Debroy C. & Riley L.W. 2009.** Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*. 49(3): 365-371.
- 3 **Alali W.Q., Scott H.M. & Norby B. 2010.** Assessing the similarity of antimicrobial resistance phenotypes among fecal *Escherichia coli* isolates from two aggregated occupational cohorts of humans versus swine using cluster analysis and multivariate statistics. *Preventive Veterinary Medicine*. 94(1-2): 77-83.

- 4 Andraud M., Rose N., Laurentie M., Sanders P., Le Roux A., Cariolet R., Chauvin C. & Jouy E. 2011. Estimation of transmission parameters of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strain between pigs in experimental conditions. *Veterinary Research*. 42(1): 44.
- 5 Aslam M., Diarra M.S., Service C. & Rempel H. 2009. Antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates recovered from a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*. 72(5): 1089-1093.
- 6 Barcellos D.E.S.N., Sobestiansky J., Linhares D. & Sobestiansky T. 2012. Uso de antimicrobianos. In: Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. (Eds). *Doenças dos Suínos*. 2.ed. Goiânia: Cãnone Editorial, pp.836-883.
- 7 Barton M.D. 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current Opinion in Microbiology*. 19(1): 9-15.
- 8 Blaha T. 2012. The use of antimicrobial substances in food animals: The big picture. In: *9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical hazards in pigs and pork* (Maastricht, Netherlands). pp.131-133.
- 9 Burow E., Simoneit C., Tenhagen B-A. & Käsbohrer A. 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *Escherichia coli* - a systematic review. *Preventive Veterinary Medicine*. 113(4): 364-375.
- 10 Center of Disease Control (CDC). 2013. PulseNet Protocols PNL05. *Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri*, 13p. Available at <<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>>. [Accessed October 2015].
- 11 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(3): 827-834.
- 12 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standard. CLSI document M31-A3*. 3rd edn. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 99p.
- 13 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. CLSI document M100-S22. 22nd edn. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 188p.
- 14 Codex Alimentarius. 2011. CAC/GL 77-2011. Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance. Available at <<http://www.codexalimentarius.net>>. [Accessed November 2015].
- 15 Dahlberg C. & Chao L. 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*. 165(4): 1641-1649.
- 16 Delsol A.A., Halfhide D.E., Bagnall M.C., Randall L.P., Enne V.I., Woodward M.J. & Roe J.M. 2010. Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. *International Journal Food Microbiology*. 140(2-3): 249-253.
- 17 Doublet B., Schwarz S., Kehrenberg C. & Cloeckaert A. 2005. Florfenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(5): 2106-2108.
- 18 Enne V.I., Delsol A.A., Davis G.R., Hayward S.L., Roe J.M. & Bennett P.M. 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(3): 544-551.
- 19 European Food Safety Authority (EFSA). 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report in the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*. 13(1): 1-114.
- 20 European Food Safety Authority (EFSA). 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*. 13(2): 1-178.
- 21 Humphrey B., Thomson N.R., Thomas C.M., Brooks K., Sanders M., Delsol A.A., Roe J.M., Bennett P.M. & Enne V.I. 2012. Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC Microbiology*. 12: 53.
- 22 Kong H., Hong X. & Li X. 2015. Current perspectives in pathogenesis and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 85: 44-49.
- 23 Lee M., Shin E. & Lee Y. 2014. Antimicrobial resistance and integron profiles in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 11(12): 988-997.
- 24 Looft T. & Allen H.K. 2012. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes*. 3(5): 463-467.

- 25 Melo D.B., Menezes A.P.O., Reis J.N. & Guimarães A.G. 2015. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(4): 1165-1170.
- 26 Miller G.Y. & Dickson J.S. 2009. Food safety issues and the microbiology of pork. In: Garcia J.C., Heredia N.L. & Wesley I.V. (Eds). *Microbiologically Safe Foods*. New Jersey: John Wiley & Sons, pp.209-226.
- 27 Millet S. & Maertens L. 2011. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *Veterinary Journal*. 187(2): 143-144.
- 28 Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2007. Circular Nº 130/2007/CGPE/DIPOA. Exportações de carne suína para os estados-membros da União Europeia. Available at <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. [Accessed November 2015].
- 29 Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. Instrução Normativa 26/2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Available at <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. [Accessed November 2015].
- 30 Nagaev I., Björkman J., Andersson D.I. & Hughes D. 2001. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. 40(2): 433-439.
- 31 Price L.B., Graham J.P., Lackey L.G., Roess A., Vailes R. & Silbergeld E. 2007. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environmental Health Perspectives*. 115(12): 1738-1742.
- 32 Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Fitzpatrick E.S., Fanning S. & Hartigan P.J. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd edn. Iowa: Wiley-Blackwell, 1231p.
- 33 Sáenz Y., Zarazaga M., Briñas L., Ruiz-Larrea F. & Torres C. 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(4): 1001-1005.
- 34 Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duijkeren E., Johnson A.P. & Gaastra W. 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(4): 601-604.
- 35 Thorsteinsdottir T.R., Haraldsson G., Fridriksdottir V., Kristinsson K.G. & Gunnarsson E. 2010. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. *Zoonoses Public Health*. 57(3): 189-196.
- 36 Wang X-M., Jiang H-X., Liao X-P., Liu J-H., Zhang W-J., Zhang H., Jiang Z-G., Lü D-H., Xiang R. & Liu Y-H. 2010. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS Microbiology Letters*. 306(1): 15-21.
- 37 Wedel S.D., Bender J.B., Leano F.T., Boxrud D.J., Hedberg C. & Smith K.E. 2005. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997-2003. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12): 1899-1906.
- 38 Wu S., Dalsgaard A., Vieira A.R., Emborg H-D. & Jensen L.B. 2009. Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 135(3): 254-259.