JÉSSICA NACARATO REPLE

Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em
***Escherichia coli* de origem aviária: análise crítica sobre**
biossegurança e uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil

São Paulo

2020

JÉSSICA NACARATO REPLE

**Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em
Escherichia coli de origem aviária: análise crítica sobre
biossegurança e uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3892
FMVZ

Reple, Jéssica Nacarato

Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em *Escherichia coli* de origem aviária: análise crítica sobre biossegurança e uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil / Jéssica Nacarato Reple. – 2020.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. Biossegurança. 2. Saúde Única. 3. *Escherichia coli*. 4. Colistina. 5. Genes mcr. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em *Escherichia coli* de origem aviária: análise crítica sobre o uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil", protocolada sob o CEUA nº 1165050118 (10/008718), sob a responsabilidade de **Terezinha Knöbl** e equipe; *Jéssica Nacarato Reple* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "Epidemiological markers of resistance to colistin in avian *Escherichia coli*: critical analysis on the use of antimicrobials in poultry farming in Brazil", utilizing 400 Birds (males and females), protocol number CEUA 1165050118 (10/008718), under the responsibility of **Terezinha Knöbl** and team; *Jéssica Nacarato Reple* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **02/2020** Área: **Ornitopatologia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie:	Aves	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	14 a 35 dias	N:	400
Linhagem:	Cobb			Peso:	500 a 1500 kg		

Local do experimento: Laboratório de Medicina Aviária VPT fmvz

São Paulo, 21 de outubro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em <i>Escherichia coli</i> de origem aviária: análise crítica sobre o uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 20			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: JESSICA NACARATO REPLE			
6. CPF: 410.085.038-78		7. Endereço (Rua, n.º): AVENIDA DOS EUCALIPTOS INDIANÓPOLIS 155 SÃO PAULO SÃO PAULO 04517050	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: 11974583901	10. Outro Telefone: 11. E-mail: jessica.reple@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p> <p>Data: 26 / 09 / 2018</p> <p> Assinatura</p>			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO		13. CNPJ: 63.025.530/0019-33	14. Unidade/Órgão: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
15. Telefone: (11) 3091-1361		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Responsável: CPF: 290639938-00</p> <p>Cargo/Função: José Antonio Visintini Diretor</p> <p>Data: 26 / 09 / 2018</p> <p> Assinatura</p> <p> </p>			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.

Prof. Dr. José Luiz Gatto Dias
Chefe do Departamento de Patologia
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REPLE, Jéssica Nacarato

Título: Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em *Escherichia coli* de origem aviária: análise crítica sobre biossegurança e uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, a quem devo tudo que eu sou; à minha vó Mê que sempre me instigou a ser curiosa e à Neusinha que, com sua humildade, sempre me ajudou e incentivou a ir em busca do que eu acredito.

AGRADECIMENTOS

Ao universo, refletido para mim em Deus e em todas as entidades que acredito, que sempre me apresenta a pessoas incríveis ao longo do caminho e me presenteia com saúde, coragem e resiliência diariamente.

À minha família, por toda compreensão e apoio durante esta jornada. Em especial à minha mãe por ser exemplo de dedicação e por seu amor incondicional; à minha irmã Marina, companheira dessa e de outras vidas; à minha irmã de coração, Bruna e aos meus avós, Elza e Orlando, que são pessoas íntegras e do bem, fontes de experiência e sabedoria.

A todos meus amigos; dentre eles Joca, Kiz, Nou, Pin e Kika, que estão sempre ao meu lado, me escutando, dando forças e deixando a vida mais leve.

À minha orientadora Profa. Dra. Terezinha Knöbl, a quem tenho como inspiração profissional e pessoal, por toda sua sábia orientação e conselhos, pela paciência e confiança em mim.

À toda a equipe do Laboratório de Sanidade Suína e do Laboratório de Medicina Aviária da FMVZ-USP, em especial à Fernanda, Leticia, Vitória, Yamê e Gabi que me auxiliaram com os experimentos e, sem dúvidas, ao Marcos que, além de ter me orientado de forma precisa e compreensiva, tive a feliz oportunidade de ter aprendido muito com ele.

À Vanessa, por ter me auxiliado de forma inestimável e com muito profissionalismo durante a etapa final das análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada e à Elanco, por terem possibilitado aprimorar meus conhecimentos técnicos.

A todos os veterinários, técnicos de campo e granjeiros das integrações, que me receberam de portas abertas e com disposição para ajudar, possibilitando a realização do presente trabalho.

“Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)

RESUMO

REPLE, J.N. **Marcadores epidemiológicos de resistência à colistina em *Escherichia coli* de origem aviária**: análise crítica sobre biossegurança e uso de antimicrobianos em avicultura no Brasil. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A biossegurança é uma estratégia importante para manutenção da produtividade e sanidade na produção animal, aliada ao uso prudente de antibióticos. A colistina pertence à classe das polimixinas, classificada como criticamente importante para a medicina humana. O aumento da procura de genes *mcr* demonstra a crescente preocupação com a transferência de resistência a este antimicrobiano entre animais e seres humanos. Os objetivos do presente estudo foram avaliar parâmetros de biossegurança nas granjas e verificar correlações com desempenho zootécnico, positividade de *Salmonella* spp. e uso de antibióticos. Adicionalmente, foi investigado o fenótipo de resistência à colistina e a frequência de ocorrência dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nos isolados de *E. coli* de fezes de frango de corte de 4 Integrações no sudeste do Brasil. O Escore de Biossegurança não apresentou correlação com o IEP, prevalência de *Salmonella* spp. e uso de antibióticos; mas apresentou baixa correlação com Ganho de Peso Médio das fêmeas. Adicionalmente, o aumento do uso de antimicrobianos apresentou diferença estatística com a maior prevalência de *Salmonella* spp. e mortalidade final. Estes resultados demonstram que outros fatores podem impactar o desempenho zootécnico e *status* sanitário dos lotes, ademais da biossegurança. Encontrou-se uma baixa frequência de ocorrência de *E. coli* resistente à colistina nas quatro integrações (9/389 - 2,3%), com maior prevalência de estirpes resistentes na Integração 2 (4,0%) que utilizou o antibiótico recentemente quando comparada às demais (1,1% - 2,0%). Não foram identificados os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nos isolados. 44,4% (4/9) das estirpes resistentes à colistina também foram caracterizados como multirresistentes e, uma delas, apresentou fenótipo de resistência estendida aos betalactâmicos. A resistência à colistina pode ser cromossomal ou mediada por outros genes *mcr* não identificados.

Palavras-chave: Biossegurança. Saúde Única. *Escherichia coli*. Colistina. Genes *mcr*.

ABSTRACT

REPLE, J.N.. **Epidemiological markers of colistin resistance in avian origin *Escherichia coli***: a critical analysis of biosecurity and the use of antimicrobials in poultry in Brazil. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Biosecurity is an important strategy for maintaining productivity and health in animal production, combined with prudent use of antibiotics. Colistin belongs to the class of polymyxins, classified as critically important to human medicine. The increasing search for *mcr* genes demonstrates the growing concern about the transfer of resistance to this antimicrobial between animals and humans. The objectives of this study were to evaluate farm biosecurity parameters and to verify correlations with zootechnical performance, *Salmonella* spp. and use of antibiotics. In addition, the colistin resistance phenotype and the frequency of occurrence of the *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr*-4 and *mcr*-5 genes in *E. coli* isolates of broiler chicken feces of 4 companies in southeastern Brazil were investigated. The Biosecurity Score did not correlate with the EPI, prevalence of *Salmonella* spp. and use of antibiotics; but presented low correlation with Average Weight Gain of females birds. Additionally, the increased use of antimicrobials was statistically different with the higher prevalence of *Salmonella* spp. and final mortality. These results demonstrate that other factors may impact the zootechnical performance and health status of the flocks, besides biosecurity. A low frequency of colistin resistant *E. coli* was found in the four companies (9/389 - 2.3%), with a higher prevalence of resistant strains in Integration 2 (4.0%) which used the antibiotic recently when compared to the others (1.1% - 2.0%). The genes *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr*-4 and *mcr*-5 were not identified in the isolates. 44.4% (4/9) of the colistin resistant strains were also characterized as multiresistant and one of them presented extended resistance phenotype to betalactamics. Colistin resistance may be chromosomal or mediated by other unidentified *mcr* genes.

Keywords: Biosecurity. One Health. *Escherichia coli*. Colistin Genes *mcr*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos componentes básicos de um programa de biossegurança	21
Figura 2 - Imagens das granjas apresentando falhas de biossegurança	33
Figura 3 - Imagens das granjas que demonstram a boa implementação das práticas de biossegurança	36
Figura 4 - Principais vias de seleção e disseminação de <i>Escherichia coli mcr-1+</i> em animais, seres humanos e meio ambiente	63
Figura 5 - Coleta de fezes frescas diretamente da cama de aviário com auxílio de suabes estéreis	71
Figura 6 - Seleção de colônia de <i>Escherichia coli</i> isolada em ágar MacConkey ..	72
Figura 7 - Estirpes de <i>Escherichia coli</i> sensíveis à colistina (esquerda) e resistentes à colistina (direita) analisadas pelo micrométodo de eluição de disco	76
Figura 8 - Isolado de <i>Escherichia coli</i> apresentando produção de β -lactamase - formato da junção entre ácido clavulânico (AMC) e ceftiofur (CFT)	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso de antibióticos terapêuticos durante 2018 nas granjas avaliadas com escore de biossegurança.	40
Tabela 2 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima de colistina para <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de frangos de corte	77
Tabela 3 - Sensibilidade a outros antibióticos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> com característica fenotípica de resistência à colistina.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Escore de biosseguridade determinado através de <i>check list</i> aplicado em 20 granjas (A-T) de frangos de corte.....	38
Gráfico 2 - Índice de Eficiência Produtiva (IEP) das 20 granjas (A-T) avaliadas ..	39
Gráfico 3 - Escore de Biosseguridade e Índice de Eficiência Produtiva (IEP) médio das 20 granjas (A - T) avaliadas	39
Gráfico 4 - Porcentagem (%) de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp. nas 20 granjas avaliadas (A - T)	41
Gráfico 5 - Porcentagem (%) das granjas que apresentaram os aspectos de biosseguridade como inadequados ou com necessidade de ajustes.....	42
Gráfico 6 - Comparação das médias de Escore de Biosseguridade com Classificação do Índice de Eficiência Produtiva (IEP)	43
Gráfico 7 - Análise Estatística de correlação entre Escore de Biosseguridade e Ganho de Peso Médio das fêmeas.....	44
Gráfico 8 - Análise Estatística de correlação entre Escore de Biosseguridade e Prevalência de <i>Salmonella</i> spp	44
Gráfico 9 - Comparação das médias de Escore de Biosseguridade e Uso de Antibióticos.....	45
Gráfico 10 - Comparação das médias de prevalência de <i>Salmonella</i> spp. e Uso de Antibióticos.....	46
Gráfico 11 - Comparação das médias de Mortalidade Final e Uso de Antibiótico.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos utilizados na medicina humana segundo a Organização Mundial da Saúde	59
Quadro 2 - Descrição da sequência dos <i>primers</i> e tamanho dos produtos amplificados, utilizados na identificação dos genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	74
Quadro 3 - Formulário de Biossegurança	98

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
	CAPÍTULO I: BIOSSEGURIDADE COMO ESTRATÉGIA DE MANUTENÇÃO DA SANIDADE E PRODUTIVIDADE	19
1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	BIOSSEGURIDADE – CONCEITOS BÁSICOS E LEGISLAÇÃO	20
1.2	BIOSSEGURIDADE – SANIDADE E PRODUTIVIDADE	25
2	OBJETIVOS	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	SELEÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO	30
3.2	OBTENÇÃO DOS DADOS	30
3.3	CHECK LIST DE BIOSSEGURIDADE	31
3.4	ANÁLISE DOS DADOS	32
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	55
	CAPÍTULO II: MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE RESISTÊNCIA À COLISTINA EM <i>Escherichia coli</i> DE ORIGEM AVIÁRIA	56
1	REVISÃO DE LITERATURA	57
1.1	SAÚDE ÚNICA	57
1.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> E RESISTÊNCIA À COLISTINA	61
2	OBJETIVOS	70
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1	COLETA DE AMOSTRAS	71
3.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	72
3.3	MICROMÉTODO DE ELUIÇÃO DE DISCO	72
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA	73
3.5	REAÇÃO EM CADEIA PELA AÇÃO DA POLIMERASE	73
3.6	ANTIBIOGRAMA	74
4	RESULTADOS	76
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICES	97

INTRODUÇÃO

O aumento da produtividade animal nas últimas décadas contribuiu para suprir a demanda de alimentos de uma população em crescimento e para o sucesso de diversas economias ao redor do mundo. No entanto, as atuais condições de criação favoreceram os surtos de doenças nos animais e as toxinfecções alimentares em humanos oriundas de produtos de origem animal (VIEIRA et al., 2009; VAN STEENWINKEL et al., 2011; KOUTSOUMANIS et al., 2019). O aumento na densidade e redução dos períodos de vazio sanitário, aliados às novas estratégias de redução do uso de antibióticos na produção animal, são fatores de risco que acarretaram na reemergência de infecções, fazendo da biossegurança uma estratégia importante para a sanidade e, conseqüentemente, produtividade dos lotes.

Falhas na biossegurança acarretam prejuízos consideráveis para a indústria avícola (SIEWERDT, 2005; SEIXAS, 2019), com perda de produtividade, aumento de tratamentos e comprometimento da imagem da empresa com impacto nas exportações, além de multas e indenizações.

O sucesso de políticas de aprimoramento da biossegurança nas granjas exige um convencimento no âmbito econômico, demonstrando aos produtores as perdas em desempenho zootécnico e possíveis embargos nas exportações da carne, quando infecções por diferentes patógenos são instaladas por falha na biossegurança. Medidas adicionais do governo, como incentivos financeiros ou multas, também podem ser uma opção para facilitar a implementação destas medidas.

Concomitantemente há uma pressão governamental, dos consumidores e da mídia para o uso prudente de antibióticos em animais de produção; o que condiz muitas vezes com a redução do uso de algumas classes destes antimicrobianos; tendo como base a preocupação de transferência de genes de resistência a antibióticos entre animais e humanos.

Dentre os antimicrobianos, os antibióticos classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como classes prioritárias dentre os criticamente importantes em humanos, tem um uso cada vez mais restrito na produção animal, na tentativa de resguardar tais princípios ativos para tratamento de doenças graves nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Neste contexto, a colistina é considerada como último recurso para tratamento das infecções bacterianas por bactérias gram negativas multirresistentes, principalmente ao grupo dos carbapenêmicos.

Acreditava-se que a resistência à colistina era baseada somente em mutações cromossomais até que, no final de 2015, foi primeiramente reportado o mecanismo de resistência às polimixinas mediado por plasmídeo, com a descoberta do gene *mcr-1* (*mobilized colistina resistance-1*), identificado em Enterobacteriaceae na China (LIU et al., 2016). Desde então, estudos epidemiológicos evidenciaram a presença de *E. coli mcr-1+* em diversas fontes e em vários países (KATSUNUMA et al., 2007; GALES; JONES; SADER, 2011; KEMPF et al., 2013; LIM et al., 2016), incluindo o Brasil (CORRÊA, 2013; CUNHA, 2018; MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019).

Subsequentemente novos genes plasmidiais; *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*; foram descritos em Enterobacteriaceae (XAVIER et al., 2016; BOROWIAK et al., 2017; CARATTOLI et al., 2017; YIN et al., 2017) e a descoberta de novos genes *mcr* e suas variantes é iminente, sendo o *mcr-9* o último reportado em uma cepa de *Salmonella* Typhimurium (CARROLL et al., 2019). A presença de estirpes portadoras destes genes em *E. coli* isoladas de animais de produção, de alimentos e do ambiente indica uma possível transmissão entre estes setores.

A pauta atual da OMS permeia a preocupação de como o consumo de antibióticos em animais pode contribuir para o aumento dos níveis de resistência em seres humanos. No princípio de Saúde Única, em que a saúde animal, saúde humana e meio ambiente estão conectados (AVMA, 2008), medidas de biossegurança são estratégias importantes para assegurar o bem-estar e a sustentabilidade destes pilares.

Embora estirpes de *E. coli mcr+* já tenham sido descritas nas criações de aves e suínos, os dados de frequência de ocorrência em avicultura no sudeste do Brasil são desconhecidos. Ademais, a avaliação crítica do *status* de biossegurança nas granjas é uma prática pouco utilizada.

Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar parâmetros de biossegurança e correlacioná-los com dados de desempenho zootécnico, positividade de *Salmonella* spp. e uso de antibióticos. Adicionalmente, foi investigada a frequência de ocorrência dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em *Escherichia coli* isolada de fezes de frango de corte no sudeste do Brasil, devido a importância da colistina no contexto de Saúde Única.

**CAPÍTULO I: BIOSSEGURIDADE COMO ESTRATÉGIA DE MANUTENÇÃO
DA SANIDADE E PRODUTIVIDADE**

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 BIOSSEGURIDADE: CONCEITOS BÁSICOS E LEGISLAÇÃO

A aplicação das práticas de biosseguridade nos sistemas de criação animal está alinhada com a iminente necessidade de uma produção de alimentos sustentável e eficiente.

Medidas de biosseguridade visam evitar a introdução e disseminação de agentes infecciosos, a fim de reduzir as consequências de uma infecção em determinada população (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997; AMASS et al., 2000). Um programa de biosseguridade robusto e eficaz é a melhor alternativa para o controle de patógenos que interferem na produtividade animal ou que representem uma ameaça para a saúde pública (SESTI, 2005).

Estudo conduzido por Laanen et al. (2014) mostrou que apesar de aproximadamente metade dos entrevistados na área de suínos, bovinos e aves estarem convencidos do efeito positivo da biosseguridade na redução de doenças, menos de 10% dos produtores destes setores foram capazes de explicar corretamente o significado do termo “biosseguridade”.

Conceitualmente e, em aspectos práticos, biossegurança não é o mesmo que biosseguridade. As normas de biosseguridade (relacionadas a riscos à saúde animal e vegetal e, por consequência, humana) devem ser adaptáveis e flexíveis de acordo com o sistema de produção em questão. Em contrapartida, as normas de biossegurança (relacionadas a riscos à saúde humana) são permanentes e inflexíveis. Ou seja, enquanto normas de biosseguridade devem sempre serem revisadas rotineiramente; as normas de biossegurança, uma vez consolidadas, somente poderão ser modificadas para se tornarem ainda mais restritivas (SESTI, 2004).

Sesti (2005) representou de forma esquemática o programa de biosseguridade como uma corrente (Figura 1): cada elo (componentes do programa) possui a mesma importância e, o programa só será efetivo se todos os itens estiverem em equilíbrio, com a maximização dos pontos fortes e pontos fracos minimizados para todos os elos.

Figura 1 - Representação esquemática dos componentes básicos de um programa de biossegurança

Fonte: Sesti (2005).

Os impactos dos lapsos de biossegurança são alarmantes e podem acometer tanto a produção e sanidade animal quanto a saúde humana, resultando em prejuízos econômicos homéricos.

Em 2004, no sudeste asiático, o vírus da Influenza Aviária de alta patogenicidade H5N1 foi responsável pela mortalidade de milhões de aves e casos de infecção e óbitos em humanos. No mesmo período, três estados dos Estados Unidos (Delaware, Maryland e Virginia) de avicultura de corte altamente tecnificada foram atingidos por focos de H7N2, de alta virulência; com perdas restritas à produção comercial, mas sem risco para a população humana. Comparativamente, além das diferenças nas instalações, um dos fatores que ditou o impacto da gripe aviária nestas duas regiões foram as diferentes condições de biossegurança (SIEWERDT, 2005). As produções de aves apresentam vulnerabilidades diferentes aos surtos de doenças de acordo com a densidade das aves e as práticas de manejo adotadas (VIEIRA et al., 2009). Empresas que adotam medidas básicas de biossegurança estão 8,45 vezes mais protegidas contra Influenza Aviária (H5N1 de alta patogenicidade) na comparação com empresas sem programas de biossegurança (FASINA et al., 2012).

O real impacto no tamanho do rebanho de suínos da China, devido a Peste Suína Africana (PSA) iniciada em Agosto de 2018, é muito difícil de mensurar. Estima-se que as perdas devem comprometer de 20% a 70% do rebanho, com uma previsão de cinco anos para que a produção de carne suína se recupere totalmente (SEIXAS,

2019). A dificuldade de controle da PSA reside nos seguintes fatores: presença de suídeos silvestres, extensa fronteira com vários países asiáticos e de difícil fiscalização e, principalmente, ao fato da maioria das criações ser de natureza informal e, portanto, carentes de biossegurança (DIXON; SUN; ROBERTS, 2019).

Informações insuficientes sobre os custos e, especialmente, sobre o retorno sobre o investimento das implementações podem ser o principal obstáculo para a aplicação de medidas preventivas (LAANEN et al., 2014). Estudo de Lagatta e Gameiro (2017) sugere que a implantação de medidas de biossegurança em granja de postura comercial tem custo relativamente baixo (aproximadamente 2,0% do custo total da produção) diante dos riscos potenciais das enfermidades e os consequentes prejuízos econômicos quando os lotes são acometidos. Os autores também pontuam que, além do custo, há outros fatores críticos para o sucesso da implementação de medidas de biossegurança, tais como o acesso à informação, falta de políticas para crédito agrícola e sucessivas alterações na legislação que diminui a credibilidade do programa para sanidade avícola. Siekkinen et al. (2012) estimaram que o custo médio com biossegurança na Finlândia é de 3,55 centavos de euro por ave na produção de frangos de corte e 75,7 centavos de euro na produção de ovos para incubação.

A biossegurança tem forte dependência do comportamento humano (SESTI, 2004). Para as medidas de biossegurança serem efetivas elas devem ser aplicadas de forma consistente e por todas as pessoas envolvidas na produção. A capacitação da equipe que trabalha diretamente nos galpões e a aplicação prática de todos os itens críticos é fundamental para o sucesso no controle de infecções. Racicot et al. (2011) identificaram 44 erros durante o procedimento de ingresso e saída nos galpões de aves, sendo os principais relacionados a delimitação de área limpa *versus* área suja (61,4%), troca de botas (13,6%) e lavagem das mãos (11,4%). Apenas 2,9% (26/883) das visitas avaliadas não apresentaram violações na biossegurança. Os erros de biossegurança podem ser intencionais, relacionados a crenças e atitudes, ou não-intencionais, sugestivos da falta de entendimento do que era para ser feito. Os autores sugerem que a natureza e frequência dos erros remetem a uma falta de entendimento em relação aos princípios de biossegurança e a necessidade da criação de materiais educacionais para treinamento dos trabalhadores de granjas.

Em 2001, foi realizado um estudo com 72 veterinários norte-americanos que identificaram a comunicação como o componente mais importante de um bom plano de biossegurança, além da implementação de treinamentos como fator-chave para o

sucesso destas medidas (VAILLANCOURT, 2009). Exemplificando, o comprometimento em lavar as mãos nos hospitais, antes e depois do contato com pacientes, passou de 13% e 15% para 73% e 81% após implementação de um programa educacional, respectivamente (CONLY et al., 1989). A equipe de apanha das aves pré-abate, ao receber treinamento específico em relação a biosseguridade, aumentou seu conhecimento sobre a identificação de pontos críticos de controle ao longo do processo em 39 pontos percentuais (MILLMAN et al., 2017). Essencialmente o conceito de biosseguridade deve ser completamente entendido por qualquer pessoa envolvida no sistema de produção, antes de qualquer tentativa de aplicação operacional (SESTI, 2005; CARDONA, 2012).

Em 2007, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu a Instrução Normativa nº 56 (BRASIL, 2007), com o objetivo de: “estabelecer os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução e comerciais”. Posteriormente foram feitas alterações pontuais, refletidas na IN 59/2009 (BRASIL, 2009), IN 36/2012 (BRASIL, 2012) e, mais recentemente, na IN 08/2017 (BRASIL, 2017); todas pautadas em princípios de biosseguridade.

As adequações às normativas incluem itens de infraestrutura das instalações, como cercas de isolamento e arcos de desinfecção de veículos; procedimentos referentes ao controle de pragas (roedores, insetos), limpeza e desinfecção adequada das instalações e dos equipamentos; além de medidas de boas práticas de produção.

Os itens VII e VIII do Artigo nº 9, Capítulo 2, da IN nº 56; refletidos no Anexo IV-A da Instrução Normativa (BRASIL, 2007), requerem, para registro do estabelecimento avícola, um memorial descritivo das medidas higiênicos-sanitárias e de biosseguridade adotadas, dentre elas: manejo; localização e isolamento das instalações; barreiras físicas e naturais; controle do acesso e fluxo de trânsito de veículos e pessoas; limpeza e desinfecção da instalação e veículos, controle de pragas, documento comprobatório da qualidade microbiológica, física e química da água de consumo; cuidados com a ração; programa de saúde avícola; plano de contingência; destino de resíduos de produção, além de um plano de capacitação da equipe.

A classificação de locais de produção de aves em relação à biosseguridade é importante para o desenvolvimento de estratégias de vigilância baseadas em riscos, introdução de políticas governamentais e recomendações práticas para os produtores.

O desenvolvimento de perfis de risco genéricos pode auxiliar no direcionamento de sistemas de vigilância, alertas precoces em áreas de alto risco, promoção de medidas que reduzam o risco de entrada de doenças nas granjas e geração de informação para modelos de simulação espacial estocásticos reproduzirem surtos de doenças (VAN STEENWINKEL et al., 2011).

1.2 BIOSSEGURIDADE – SANIDADE E PRODUTIVIDADE

Práticas de biosseguridade e de manejo bem estruturadas e implementadas possuem outros objetivos como a redução ou eliminação do uso de antibióticos; além do aumento da produtividade e de alcançar um alto *status* sanitário dos animais, resultando na produção de carne mais saudável e segura (RIBBENS et al., 2008). A redução do uso de antibióticos pode, em alguns casos, somente ser factível quando uma melhoria na biosseguridade e/ou o uso de vacinas é implementado (AARESTRUP, 2015). Para possibilitar a redução do uso de antimicrobianos é importante assegurar animais mais saudáveis, diminuindo assim a necessidade do tratamento com antibióticos (POSTMA et al., 2016).

Diferentes condições ambientais, derivadas de diferenças na estrutura das instalações por exemplo, interferem diretamente na constituição da comunidade bacteriana e, conseqüentemente, nos desafios encontrados na cama dos galpões (DUMAS et al., 2011). Assim, as práticas podem ser aplicadas em vários pontos: origem das aves, barreiras e acesso aos lotes, locais para desinfecção, protocolos de limpeza e desinfecção das instalações após a saída do lote, precauções com o trânsito de pessoas, eliminação de aves mortas, destino dos resíduos, contato com outros animais (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997). Falhas nas medidas de biosseguridade podem comprometer a resposta imunológica dos animais e, conseqüentemente, aumentar a predisposição a infecções (KA-OD; ZAKIA; KAMEL, 2008).

Uma combinação complexa de fatores é responsável por determinar a entrada e a transmissão de doenças em uma granja: número e densidade de animais, tipo de espécies ou linhagens presentes, o número e tipo de contato entre os lotes e as medidas sanitárias que são colocadas em prática (VAN STEENWINKEL et al., 2011). Neste contexto, uma análise de risco é primordial para elaboração e implementação de qualquer programa de biosseguridade (SESTI, 2004; MANUJA; MANUJA; SINGH, 2014).

Filippitzi et al. (2017) propuseram medidas de biosseguridade específicas para doenças infecciosas de suínos, após revisão de literatura das suas respectivas rotas de transmissão e avaliação de 574 rebanhos suínos em seis diferentes países europeus. Em trabalho consultivo com 111 especialistas europeus em relação a 19 alternativas ao uso de agentes antimicrobianos na produção de suínos, a

biosseguridade da área externa e interna e as melhorias nas condições de ambiência foram identificadas como as medidas mais eficazes (POSTMA et al., 2015).

Considerando que *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni* são os patógenos mais relevantes causadores de toxinfecções alimentares em humanos (LI et al., 2019), a adoção de medidas específicas para diminuir a pressão de infecção na produção animal, atuam diretamente em benefício da saúde humana.

É importante considerar que as ações direcionadas para evitar a disseminação de um determinado microrganismo podem não ser eficazes para o controle de outro patógeno. As medidas aplicadas para controle de *Salmonella* spp. nas aves geralmente são ineficientes para *Campylobacter jejuni*, devido às diferenças na fisiologia, epidemiologia e ecologia destas bactérias (NEWELL; FEARNLEY, 2003). Além disso, uma abordagem multifacetada deve ser instituída para o controle de *Salmonella* spp. e *Campylobacter*, sendo que medidas isoladas de biosseguridade podem não ser suficientes para controlar estes patógenos onipresentes na produção de aves (DALE et al., 2015).

Fraser et al. (2010) demonstraram uma correlação inversa entre a disposição dos produtores na adoção de medidas de biosseguridade que visam a redução na incidência de *Salmonella* e *Campylobacter* em granjas de suínos de terminação e frangos de corte, respectivamente, e o custo estimado destas implementações. Granjas onde os trabalhadores eram menos experientes em relação à produção de aves, a ocorrência de *Salmonella* spp. era maior; reforçando o papel do treinamento de pessoas no controle de disseminação de doenças (SYLEJMANI et al., 2016).

Uma mesma equipe trabalhando em diferentes granjas aumenta a ocorrência de *Salmonella* spp., demonstrando risco de transferência de um local para outro (SYLEJMANI et al., 2016). Trabalhadores temporários nas granjas podem ser um fator de risco potencial para infecções recorrentes por salmonela em granjas já positivas para o agente (NAMATA et al., 2009). O risco de contaminação do lote por salmonela também aumentou quando vizinhos auxiliaram no alojamento dos pintinhos no primeiro dia (LE BOUQUIN et al., 2010), evidenciando a importância de evitar a entrada de pessoas desconhecidas no sistema de criação.

Ademais, a barreira de desinfecção de veículos e sapatos é um ponto crítico no controle de salmonela pois, uma vez que o patógeno entre na granja, pode permanecer facilmente se não forem tomadas medidas eficazes para evitar sua disseminação (SYLEJMANI et al., 2016). Davies et al. (1997) identificaram que

veículos e calçados contaminados são vias potenciais para transmissão de salmonela nos lotes. O risco de contaminação por salmonela no lote aumenta, por exemplo, quando o caminhão de ração estaciona próximo a entrada dos vestiários (ROSE et al., 1999, 2000).

Apesar da limitada disponibilidade de evidências correlacionando fatores de risco com positividade de salmonela, há indícios de que o estresse, o aumento da densidade dos lotes e do número de lotes por galpão corroboram com o aumento da suscetibilidade ou da taxa de infecção por *Salmonella* (KOUTSOUMANIS et al., 2019).

Arsenault et al. (2007) investigaram os fatores de risco para colonização de aves por *Salmonella* spp. e *Campylobacter* em lotes de frangos e perus, concluindo que as chances de colonização por *Salmonella* spp. foram 2,6 vezes maiores para os lotes de frango que não trancavam as granjas permanentemente. Adicionalmente, desde 2015 no Reino Unido, todos os casos de *Salmonella* Enteritidis e a maioria dos incidentes de *S. Typhimurium* ocorreram em aves com acesso a áreas livres, demonstrando que a manutenção de uma biossegurança efetiva pode ser mais fácil em ambientes fechados (KOUTSOUMANIS et al., 2019).

Medidas de higiene e desinfecção, tais como a reposição duas vezes por semana do desinfetante de imersão das botas de entrada no aviário, reduziram pela metade a positividade de *Campylobacter* em suabes cloacais de frango de corte (GIBBENS et al., 2001). Granjas de frango de corte com altos níveis de biossegurança, além de menor conversão alimentar, apresentaram menores prevalências de *Campylobacter* (SMITH et al., 2016).

Sylejmani et al. (2016) encontraram uma forte associação entre a ocorrência de salmonela e de *Dermanyssus gallinae* (ácaro vermelho) em granjas de postura com baixos índices de biossegurança. Estes autores relataram que a ocorrência de um fator (presença de *Dermanyssus gallinae*) demonstrou ser um risco potencial para a ocorrência de um segundo fator (positividade para salmonela), evidenciando a necessidade uma visão holística no controle da disseminação de doenças. Cascudinhos, comumente presentes em galpões de frangos de corte, podem ser infectados por salmonela e transmitir a bactéria entre lotes (SKOV et al., 2004; SEGABINAZI et al., 2005; HAZELEGER et al., 2008) evidenciando a importância do controle destes insetos na produção. A presença de roedores também pode contribuir para a persistência de salmonela nos lotes (ROSE et al., 1999, 2000).

Escores de biosseguridade pré-estabelecidos apresentaram correlação positiva com o ganho de peso diário e correlação negativa com a conversão alimentar e incidência do tratamento de doenças em suínos, sugerindo que a melhora da biosseguridade auxilia na redução da quantidade de antimicrobianos utilizados de maneira profilática (LAANEN et al., 2013). Postma et al. (2016) também relataram que uma melhor biosseguridade foi relacionada com o menor uso de antimicrobianos em suínos, do nascimento ao abate.

Procedimentos de limpeza e desinfecção, sistema *all-in all-out* e lavagem das mãos são fatores que diminuem o risco de infecção por *Salmonella* spp. (NAMATA et al., 2009). O desmonte de equipamentos, tais como comedouros e bebedouros, antes da limpeza e desinfecção e o uso de um recipiente específico para descarte das aves mortas, auxiliaram a diminuir a positividade de salmonela (LE BOUQUIN et al., 2010).

A diminuição do uso de antibióticos também pode estar atrelada as melhores condições de biosseguridade aplicadas nos sistemas de produção. Globalmente, o acesso às quantidades e tipos de antibióticos utilizados em animais é limitado e desafiador, o que torna muito difícil o completo entendimento dos efeitos das políticas de uso de antibióticos (SCOTT et al., 2019).

As estimativas já realizadas sobre o uso de antibióticos na produção animal não são precisas, considerando que a própria agroindústria tem pouco controle de como os princípios ativos são utilizados na prática (SCOTT et al., 2019), dificultando a classificação de uso por espécie e indicação terapêutica, por exemplo.

Van Boeckel et al. (2015) estimaram que o consumo médio anual de antimicrobianos, em nível global, é de 45 mg/kg, 148 mg/kg e 172 mg/kg para bovinos, frangos e suínos, respectivamente. Os autores também extrapolaram o aumento de um terço no consumo de antimicrobianos na produção animal entre 2010 e 2030 sendo que, especificamente no Brasil, Rússia, Índia, China e América do Sul este aumento será de 99%. Estimativas publicadas da proporção de antibióticos utilizados na produção animal sugerem que o consumo destes compostos na agroindústria provavelmente excede o dos humanos (ROBINSON et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Considerando a biosseguridade como importante ferramenta para uma produção animal sustentável, o objetivo deste trabalho foi mensurar o nível de biosseguridade em granjas comerciais de frangos de corte no sudeste do Brasil e correlacionar os dados obtidos com produtividade (IEP – Índice de Eficiência Produtiva), sanidade (positividade de *Salmonella* spp.) e uso de antibióticos nestas propriedades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO

Um sistema de integração de frango de corte, localizado no sudeste do Brasil, foi selecionado para avaliação do nível de biossegurança (através de um *check list*) em 20 granjas componentes e os índices obtidos foram correlacionados com produtividade, positividade de *Salmonella* spp. e uso de antibióticos de 5 a 6 lotes prévios à avaliação, correspondentes ao ano de 2018.

A escolha de uma única integração para compor o estudo foi devido à similaridade de nutrição, sanidade e clima entre as unidades experimentais, com intuito de minimizar as variáveis deste estudo. A integração escolhida representa uma empresa de tamanho médio, abatendo aproximadamente 130.000 aves/dia.

A seleção das 20 granjas foi realizada por meio do Índice de Eficiência Produtiva (IEP) do ano anterior à avaliação (2018), sendo dividido em quartis e classificados com base no desempenho zootécnico em "baixo", "regular", "alto", "muito alto". Após esta divisão foram selecionadas de forma randômica 5 granjas de cada nível, totalizando as 20 unidades experimentais para aplicação do *check list* de biossegurança.

3.2. OBTENÇÃO DOS DADOS

O instrumento de pesquisa utilizado para obtenção dos dados de biossegurança foi a visita presencial à granja, realizada pelo mesmo entrevistador. As visitas foram feitas sem aviso prévio ao produtor.

As informações relativas à estrutura e condição ambiental do galpão foram avaliadas de forma visual e a aplicação das boas práticas de manejo foi avaliada por meio de questionário ao produtor, feito na mesma ordem sequencial para todos os entrevistados. O critério de inclusão dos galpões foi apenas estruturas com pressão positiva (considerados "convencionais" pela Integração). Os dados de produtividade, do uso de antimicrobianos e positividade de *Salmonella* spp. usados foram obtidos do boletim sanitário e registro de produção de cinco a seis lotes anteriores ao momento da avaliação, referentes ao ano de 2018.

A produtividade foi obtida através da média do Índice de Eficiência Produtiva (IEP) dos lotes de 2018, calculada da seguinte forma – $IEP = (\text{Ganho de peso diário (Kg)} \times \text{Viabilidade (\%)} / \text{Conversão Alimentar}) \times 100$.

3.3 CHECK LIST DE BIOSSEGURIDADE

Para elaboração do *check list* é importante uma terminologia simples, prática e com definições claras; evitando termos técnicos que prejudiquem a qualidade da resposta, diminuindo a acurácia do item de interesse. O viés de resposta é uma consideração importante ao avaliar assuntos delicados, tais como biosseguridade (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997).

O *check list* de biosseguridade foi fundamentado nas Instruções Normativas - IN 56/2007 (BRASIL, 2007), IN 59/2009 (BRASIL, 2009), IN 36/2012 (BRASIL, 2012) e IN 08/2017 (BRASIL, 2017); em um sistema de pontuação com escores ponderados de acordo com o risco, denominado Biocheck.UGent (GELAUDE et al., 2014), desenvolvido pela Universidade de Ghent na Bélgica; e com base nas práticas já implementadas pela indústria. Este contemplou 42 questões com diferentes pesos de acordo com a relevância da medida na prevenção da entrada e na disseminação de doenças na criação.

O questionário foi estruturado em 6 diferentes setores, contemplando a avaliação da área externa da granja e a área interna do galpão:

Parte I. Análise da área externa da granja

- a. Proteção da granja
- b. Área Suja
- c. Separação entre área limpa e suja

Parte II. Análise interna do galpão

- a. Manejo
- b. Limpeza e Desinfecção/Controle de pragas
- c. Qualidade da mão de obra

A resposta de cada questão foi "zero" quando inadequado, "cinco" em caso de necessidade de ajustes e "dez" para adequado, resultando em um escore final para cada granja que variou de 0 a 1000 pontos.

O *check list* empregado na obtenção dos dados está detalhado no Quadro 3 - Formulário de Biossegurança (Apêndice) e foi submetido na Plataforma Brasil do Ministério da Saúde, para avaliação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada com o objetivo de testar correlação entre o escore de biossegurança; as medidas zootécnicas, dentre elas o IEP e a prevalência de *Salmonella* spp. nos plantéis. Para tanto, foi utilizado o teste de correlação de Pearson a 0,05 de significância, sendo que a representação gráfica foi conduzida com o auxílio de gráficos de dispersão apresentando a reta de tendência da equação. Especificamente para avaliação da correlação entre Escore de Biossegurança e IEP (dividida em quartis) optou-se por utilizar ANOVA, seguida do teste de Tukey, com significância de 0,05.

O teste t foi utilizado buscando comparar as médias de escores de biossegurança, prevalência de *Salmonella* spp. e parâmetros zootécnicos entre os grupos de propriedades que fizeram ou não uso de antimicrobianos ($\alpha=0,05$). Optou-se por provas paramétricas uma vez que foi observada distribuição Normal dos dados.

Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico IBM SPSS v. 23.

4 RESULTADOS

O registro fotográfico exemplifica os pontos positivos e pontos negativos, no âmbito da biossegurança, visualizados durante as visitas às propriedades selecionadas. A Figura 2 elucida as falhas de biossegurança enquanto a Figura 3 demonstra práticas de biossegurança bem implementadas.

Figura 2 - Imagens das granjas apresentando falhas de biossegurança

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Legenda: (a) portões abertos permitindo o livre acesso de pessoas e animais; (b) cerca em más condições e presença de vegetação alta ao redor do galpão; (c) e (d) desorganização nos arredores da propriedade e presença de entulhos, potencial abrigo para roedores; (e), (f), (g), (h), (i) e (j) baixa qualidade no processo de compostagem, presença de chorume, composteiras abertas e desprotegidas da chuva e acesso de animais, carcaças expostas, problemas estruturais; (k) e (l) pias desorganizadas impossibilitando a correta higienização das mãos; (m) e (n) uso impróprio das iscas de roedores; (o), (p), (q) e (r) presença de fezes de animais, cães e gatos nas propriedades do galpão; (s) e (t) incorreta limpeza e desinfecção dos equipamentos; (u) e (v) armazenamento incorreto das carcaças antes do processo de compostagem.

Figura 3 - Imagens das granjas que demonstram a boa implementação das práticas de biossegurança

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Legenda: (a) área bem delimitada com cercas; (b) área limpa e vegetação baixa ao redor do galpão; (c) e (d) composteiras adequadas, com pouco chorume e cobertas; (e) e (f) adequada utilização das iscas de roedores; (g) e (h) troca de sapatos e presença de cal como barreira sanitária antes da entrada nos galpões; (i) e (j) pia com estrutura e recursos adequados para a higienização das mãos.

Em média, os sistemas avaliados obtiveram 540 pontos de escore de biosseguridade, variando de 330 até 715 pontos. Os dados encontram-se representados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Escore de biosseguridade determinado através de *check list* aplicado em 20 granjas (A - T) de frangos de corte

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

O Gráfico 2 indica o IEP de cada granja avaliada e o Gráfico 3 representa o IEP juntamente com o Escore de Biosseguridade, para melhor visualização.

Gráfico 2 - Índice de Eficiência Produtiva (IEP) das 20 granjas (A - T) avaliadas

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Gráfico 3 - Escore de Biossegurança e Índice de Eficiência Produtiva (IEP) médio das 20 granjas (A - T) avaliadas

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

O uso de antibióticos, para fins terapêuticos, foi esporádico e de forma pontual, sendo descrito na Tabela 1:

Tabela 1 - Uso de antibióticos terapêuticos durante 2018 nas granjas avaliadas com escore de biossegurança

GRANJA	NÚMERO DE GALPÕES CONVENCIONAIS	NÚMERO DE LOTES (2018)	TRATAMENTOS
A	1	6	NA
B	2	10	Galpão 01 - Doxiciclina, 300 g/dia, por 5 dias.
C	2	12	Galpão 01 - Florfenicol; 2L/dia, por 5 dias. Galpão 02 - Florfenicol; 2L/dia, por 5 dias. Galpão 01 - Neomicina; 4 kg/dia, por 5 dias.
D	1	6	Florfenicol; 3L/dia, por 5 dias.
E	1	5	Florfenicol; 1,5L/dia, por 5 dias.
F	1	6	NA
G	1	6	NA
H	5	30	NA
I	1	6	NA
J	1	6	NA
K	2	12	NA
L	1	6	NA
M	1	6	NA
N	1	6	NA
O	1	6	NA
P	1	6	Florfenicol; 5 L/dia, por 5 dias. Doxiciclina; 1,4 kg/dia, por 5 dias.
Q	1	6	NA
R	1	6	NA
S	1	6	Florfenicol; 11 L/dia, por 4 dias. Florfenicol; 6L/dia, por 5 dias. Doxiciclina; 800 g/dia, por 5 dias.
T	3	18	NA
TOTAL	29	171	11/171 (6,4%)

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Legenda: NA – não aplicado: sem uso de antibiótico terapêutico durante 2018.

Os princípios ativos utilizados como antibióticos, para fins terapêuticos, foram doxiciclina, florfenicol e neomicina.

A positividade de *Salmonella* spp. foi avaliada através da média dos resultados dos suabes de arrasto feitos ao longo de 2018 nos galpões convencionais das granjas avaliadas, demonstrados no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Porcentagem (%) de amostras positivas para *Salmonella* spp. nas 20 granjas avaliadas (A - T)

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Tópicos como “Aves de Origem controlada”, o preenchimento do “Livro de Visitas”, “Política de Vazio Sanitário para Visitantes” e “Tratamento da Cama após saída do lote” obtiveram nota máxima (10 – “adequado”) em todas as granjas (100%), pois são procedimentos exigidos pela integração.

Em contrapartida, a “Presença e funcionalidade do arco de desinfecção para veículos”; o “Registro de Desinfecção dos veículos de transporte”; “Compra de cama com controle de qualidade” e “Análise Microbiológica da Ração” são itens que obtiveram a nota mínima (0 – “inadequado”), pois nenhuma granja desta integração obedece a estes procedimentos.

A “Conformidade Sanitária da Equipe de Trabalho”, o “Treinamento dos Funcionários em relação a Biossegurança”, “Desinfecção dos comedouros e bebedouros após saída do lote” e o “Período e Respeito do Intervalo entre lotes” receberam nota 5 (“precisa de ajustes”) em todas as granjas.

O Gráfico 5 evidencia outras lacunas e principais oportunidades de implementação e melhoria nos diversos itens de biosseguridade, além dos que foram mencionados como pontos críticos para todas as granjas.

Gráfico 5 – Porcentagem (%) das granjas que apresentaram os aspectos de biosseguridade como inadequados ou com necessidade de ajustes.

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

A análise estatística entre os Escores de Biosseguridade e o Índice de Eficiência Produtiva (IEP); nos grupos “Baixo”, “Regular”, “Alto” e “Muito Alto” conforme divisão em quartis do IEP; não apresentou diferença estatística considerando significância de 5%, conforme representado no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Comparação das médias de Escore de Biosseguridade com Classificação do Índice de Eficiência Produtiva (IEP)

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Nota: a, b - médias com letras diferentes apresentam diferença estatística (P-valor $\leq 0,05$).

No entanto, em relação a outros fatores de desempenho zootécnico também avaliados (conversão alimentar, mortalidade, ganho de peso diário), o escore de biosseguridade apresentou uma baixa correlação com Ganho de Peso Médio das fêmeas (Gráfico 7) (Coeficiente de Pearson (R) = 0,176; P valor = 0,021) ao estender as análises por lotes (n=171).

Gráfico 7 - Análise Estatística de correlação entre Escore de Biossegurança e Ganho de Peso Médio das fêmeas

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

O Escore de Biossegurança não teve correlação significativa com a Prevalência de *Salmonella* spp. nas 20 granjas avaliadas (Coeficiente de Pearson (R) = 0,052; P valor = 0,828) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Análise Estatística de correlação entre Escore de Biossegurança e Prevalência de *Salmonella* spp.

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Em relação ao uso de antibióticos, não houve diferença estatística pelo teste-t ($P\text{-valor} = 0,737$), com relação ao escore de biossegurança, demonstrado no Gráfico 9. A média do escore de biossegurança foi 550 pontos para lotes que não utilizaram antibióticos e 538 pontos para lotes que utilizaram antibióticos.

Gráfico 9 - Comparação das médias de Escore de Biossegurança e Uso de Antibióticos

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Nota: a, b - médias com letras diferentes apresentam diferença estatística ($P\text{-valor} \leq 0,05$).

Na comparação das médias do uso de antimicrobianos e prevalência de *Salmonella* spp. obteve-se 21% de *Salmonella* spp. nos lotes que não utilizaram antibiótico *versus* 34% de *Salmonella* spp. nos lotes que utilizaram antibióticos, apresentando diferença estatística significativa ($P\text{-valor} = 0,003$) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Comparação das médias de prevalência de *Salmonella* spp. e Uso de Antibióticos

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Nota: a, b - médias com letras diferentes apresentam diferença estatística (P-valor $\leq 0,05$).

A densidade de aves (Coeficiente de Pearson (R) = 0,250; P valor = 0,288) e o número total de aves por galpão (Coeficiente de Pearson (R) = 0,151; P valor = 0,524) também foram avaliados, mas não apresentaram correlação significativa com o aumento da prevalência de *Salmonella* spp..

Em relação a mortalidade final (%), as médias apresentaram diferença estatística ao nível de significância de 5% na comparação com lotes que utilizaram antibióticos (7,78%) com lotes que não utilizaram antibióticos (4,17%), P-valor = 0,012 (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Comparação das médias de Mortalidade Final e Uso de Antibióticos

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Nota: a, b - médias com letras diferentes apresentam diferença estatística ($P\text{-valor} \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O registro fotográfico (Figura 2 e Figura 3) proporcionou a avaliação dos aspectos de biossegurança que foram bem executados e outros com falhas na implementação. Importante ressaltar que o *check list* retrata a situação da biossegurança no momento da avaliação que, pela visita não ter sido previamente agendada, tende a representar a situação real da granja. Além da implementação de um *check list* de biossegurança por alguns autores (LAANEN et al., 2014), outros pesquisadores utilizaram vídeos para verificar as práticas de biossegurança de uma forma contínua (RACICOT et al., 2011), com a vantagem de avaliar as práticas implementadas durante todo o ciclo de produção e, em determinadas condições, avaliar especificamente situações comportamentais (lavagem das mãos antes da entrada nos galpões, por exemplo) em relação à biossegurança.

Ao utilizar o modelo de corrente de Sesti (2005) (Figura 1), que compreende diversos componentes de um programa de biossegurança, é possível notar que o Formulário de Biossegurança (Quadro 3) aborda a grande parte dos itens (controle de tráfego, educação continuada; por exemplo) no entanto, a avaliação detalhada e precisa de alguns itens como limpeza e desinfecção podem ter sido negligenciadas, já que o momento de análise foi único e as medidas implementadas devem ser contínuas.

As práticas de biossegurança adotadas devem compreender desde o período em que as aves não estão presentes no galpão (intervalo entre lotes ou vazio sanitário) até o destino final das aves ao frigorífico. Os avicultores tendem a ter um maior cuidado no início da vida do frango quando comparada a criação das aves mais velhas, o que pode refletir em algumas diferenças dependendo do momento da visita – duas das vinte visitas foram realizadas no período de intervalo entre lotes.

Além do aspecto visual das instalações e conferência de registros, alguns procedimentos e comportamentos adotados eram perguntas ao integrado, dependentes da assertividade da resposta quando não podiam ser conferidos. Sesti (2004) menciona que o sucesso da biossegurança é fortemente dependente do comportamento humano, sendo que a comunicação efetiva e aplicação de treinamentos são primordiais para um plano de biossegurança assertivo (VAILLANCOURT, 2009).

Dentre os principais objetivos na implementação de práticas de biossegurança está a manutenção da sanidade dos animais e, conseqüentemente, a repercussão no aumento de produtividade e redução do uso de antibióticos, condizendo com uma produção de alimento com qualidade e em quantidade (RIBBENS et al., 2008; AARESTRUP, 2015; POSTMA et al., 2016).

O escore de biossegurança não apresentou diferença estatística significativa com o Índice de Eficiência Produtiva (Gráfico 6) e uma baixa correlação com Ganho de Peso Médio das fêmeas (Gráfico 7), o que condiz com o trabalho conduzido em suínos por Dutra (2017) que não encontrou diferença estatística entre escores de biossegurança e desempenho zootécnico dos animais. Já Smith et al. (2016) relataram que granjas de frango de corte com altos níveis de biossegurança apresentaram menor conversão alimentar, não encontrado no presente trabalho. Escores de biossegurança pré-estabelecidos também apresentaram correlação positiva com o ganho de peso diário e correlação negativa com a conversão alimentar em suínos (LAANEN et al., 2013). Procedimentos de limpeza e desinfecção, etapas importantes dentro do ciclo de produção, apresentaram correlação positiva com o desempenho de frangos de corte (BURBARELLI et al., 2015).

O fato do Escore de Biossegurança ter apresentado correlação, apesar de baixa, com Ganho de Peso Médio das fêmeas (Gráfico 7) e não com o Índice de Eficiência Produtiva (Gráfico 6) pode ser explicada pela complexidade dessa fórmula que compreende ganho de peso diário, viabilidade e conversão alimentar. Apesar da equidade na nutrição das granjas avaliadas e sazonalidade (lotes ao longo de 2018), por exemplo, muitos outros fatores ainda particulares de cada granja podem estar envolvidos na determinação do IEP, tais como o manejo e ambiência de cada galpão.

O presente trabalho também não apresentou correlação entre os escores de biossegurança e a prevalência de *Salmonella* spp. nas 20 granjas avaliadas (Gráfico 8). Devido à complexidade de fatores envolvidos na introdução e disseminação de patógenos em um lote (VAN STEENWINKEL et al., 2011), uma análise de risco é essencial no contexto de um programa de biossegurança robusto (SESTI, 2004; MANUJA; MANUJA; SINGH, 2014). No entanto, particularidades fisiológicas e epidemiológicas dos patógenos devem ditar as ações de controle do microrganismo em questão (NEWELL; FEARNLEY, 2003) sendo fundamental uma abordagem multifatorial pois, medidas isoladas de biossegurança, podem ser insuficientes para controlar estes agentes (DALE et al., 2015). É necessário um tempo de inatividade

suficiente entre os lotes (idealmente 2 semanas), conhecido como vazio sanitário, para reduzir a carga bacteriana e viral no galpão (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997). O período de vazio sanitário não foi avaliado no presente trabalho.

Exemplificando a correlação de biossegurança com outros patógenos, Dutra (2017) também não encontrou correlação entre a biossegurança e o *status* de *Mycoplasma hyopneumoniae* das granjas de suínos estudadas.

Um dos pontos críticos a ser reavaliado na maioria das granjas (Figura 2) é o processo de compostagem. Os sistemas de produção geram um grande volume de animais mortos que precisam ser descartados de uma maneira segura, prática e viável economicamente (GWYTHIER et al., 2011). O processo de compostagem das carcaças consiste em uma camada de carcaça entre camadas de substrato rico em carbono (ex. serragem, maravalha), permitindo a decomposição por microrganismos termofílicos que aquecem a pilha, matam a maioria dos patógenos e digerem os tecidos da carcaça em condições predominantemente aeróbicas (ABREU et al., 2009). A decomposição, maturação e qualidade do produto final são diretamente influenciados pela umidade, temperatura, relação carbono/nitrogênio e os resíduos orgânicos (BARREIRA; JUNIOR; RODRIGUES, 2006). O processo de compostagem geralmente ocorre em duas fases: fase termofílica (temperaturas acima de 70° geradas ao longo de semanas) e uma fase mesofílica (30-40°C geradas em meses) (KALBASI et al., 2005). As temperaturas geradas na fase termofílica são capazes de reduzir o número de microrganismos, no entanto, algumas bactérias, particularmente *Salmonella* spp., podem recolonizar o composto quando as temperaturas são novamente reduzidas no processo ou a pilha não é adequadamente aerada (NABC, 2004; WILKINSON, 2007), demonstrando o quanto este microrganismo pode ser reincidente em diversos locais da criação.

A entrada de veículos, ferramentas e outros equipamentos é um risco potencial de introdução de patógenos na granja; sendo a ração e a maravalha utilizada como cama dos frangos importantes vias de transmissão de *Salmonella* spp., por isso recomenda-se adquirir estes materiais de fabricantes idôneos (SIEWERDT, 2005). A identificação de potenciais transmissores de organismos patogênicos é primordial a fim de elaborar estratégias de contenção da entrada e para dificultar a disseminação dos agentes na granja (SIEWERDT, 2005; MANUJA; MANUJA; SINGH, 2014). Os humanos são fontes de infecção importantes de patógenos para os frangos; sendo

roupa, calçados, cabelo e unhas as vias de transmissão de microrganismos (SIEWERDT, 2005), ou seja, todo visitante na granja precisa de uma boa razão para estar lá (CUNNINGHAM; FAIRCHILD, 2012).

Provavelmente, devido a diversas fontes de *Salmonella* spp., as características intrínsecas deste microrganismo e a necessidade de uma abordagem em outros setores da produção (matrizes, incubatórios, fábrica de ração, por exemplo); não foi possível encontrar uma correlação direta entre escores de biossegurança e a positividade dos suabes de arrasto nas granjas avaliadas. O número e a densidade de animais, a quantidade e tipo de contato entre os lotes e as medidas sanitárias que são realizadas na prática podem determinar a entrada de um patógeno em um lote (VAN STEENWINKEL et al., 2011). No entanto, não foram encontradas correlações da densidade de aves e número de aves por galpão com a prevalência de *Salmonella* spp. no presente estudo.

Em diversos trabalhos, pontuações de biossegurança também apresentaram correlação negativa com a incidência do tratamento de doenças, sugerindo que a melhora da biossegurança auxilia na redução da quantidade de antimicrobianos utilizados de maneira profilática (LAANEN et al., 2013). O uso de antibióticos foi de forma pontual no presente trabalho (Tabela 1) e não apresentou correlação com os escores de biossegurança estabelecidos (Gráfico 9). Diferentemente do relatado por Postma et al. (2016) que relacionaram o menor uso de antibióticos em granjas suínas com melhor biossegurança. Neste estudo, o maior uso de antibióticos apresentou diferença estatística com maiores mortalidades finais (Gráfico 11).

Lotes que usaram antibióticos também apresentaram maiores médias de amostras positivas para *Salmonella* spp. em suas granjas (34% de positividade) em relação a lotes que não usaram antibióticos (21% de positividade) (Gráfico 10).

A microbiota intestinal deve estar em um estado dinâmico e de equilíbrio para o funcionamento adequado do intestino, sendo que uma comunidade intestinal saudável é composta em sua maioria por bactérias gram-positivas (YADAV; JHA, 2019). O ecossistema intestinal é estável frente a distúrbios pontuais, porém, fortes distúrbios como a utilização de antibióticos pode afetar a composição microbiana drasticamente e, a interrupção do uso de antibióticos pode não restaurar as condições pré-tratamento, aumentando a suscetibilidade à invasão de patógenos (BUCCI et al., 2012).

O uso de antibióticos nos lotes pode ter interferido na composição da microbiota e, conseqüentemente, em sua função protetiva, possibilitando a colonização por microrganismos oportunistas. Dethlefsen e Relman (2011) relataram alterações significativas e permanentes na composição da microbiota intestinal de humanos ao utilizarem ciprofloxacina, com perda da diversidade bacteriana a qual não retornou completamente ao estado inicial após cessar o uso do antimicrobiano. Xiong et al. (2018) também demonstraram, por meio da metagenômica, alterações na comunidade microbiana de fezes de frango de corte induzidas pelo uso de clortetraciclina.

Nurmi e Rantala (1973) notaram que a microbiota intestinal era responsável pelo aumento da resistência à colonização por salmonelas paratíficas, sendo que a administração de microrganismos provenientes do intestino de aves adultas protegia as aves de dois dias de vida contra a colonização por *Salmonella* Infantis. Da mesma forma, Mead e Impey (1987) atribuem o desenvolvimento gradual da microbiota intestinal à função de barreira, a qual dificulta a aderência de *Salmonella* spp. no trato entérico.

Apesar dos antibióticos utilizados (doxiciclina, florfenicol e neomicina) possuírem ação em bactérias gram-negativas, tais como as salmonelas, o uso indiscriminado ou excessivo destes agentes também pode ter selecionado bactérias resistentes a estes antimicrobianos (PERRON; QUESSY; BELL, 2008; COSBY et al., 2015; NAIR; VENKITANARAYANAN; JOHNY, 2018; YADAV; JHA, 2019), perpetuando-as no ambiente.

Lu et al. (2011) encontraram 90,9% e 98,5% de isolados de *Salmonella* Indiana resistentes a florfenicol e doxiciclina, respectivamente; e 65,3% dos isolados de *Salmonella* Enteritidis resistentes a doxiciclina.

A doxiciclina e florfenicol, pertencentes às classes das tetraciclina e anfenicóis respectivamente, são classificados como antimicrobianos altamente importantes para medicina humana e, a neomicina (classe dos aminoglicosídeos), pertence ao grupo dos antibióticos criticamente importantes para medicina humana (WHO, 2017). O uso destes antibióticos deve ser de forma criteriosa na produção animal, a fim de preservar sua utilização em seres humanos evitando a disseminação de mecanismos de resistência bacteriana.

O intuito deste trabalho não foi identificar, de forma isolada, o impacto de fatores de biossegurança específicos no desempenho zootécnico dos animais. Mas,

Tablante et al. (2002) encontraram que o aumento da frequência de limpeza das linhas de água foi associado com um bom desempenho zootécnico do lote, enquanto a presença de aves silvestres na propriedade teve uma associação negativa com a performance dos frangos.

Dentre os principais pontos críticos analisados, os itens que apresentaram principais falhas ($\geq 80\%$ das granjas não implementaram ou precisam de ajustes) foram: (1) Qualidade da mão de obra, (2) Controle de Insetos dentro do galpão, (3) Checagem da condição sanitária do lote, (4) Monitoria de roedores na área externa, (5) Local específico para animais mortos, (6) Sapatos dedicados/desinfetados, (7) Limpeza das mãos, (8) Qualidade da compostagem, (9) Caminhos na granja pavimentados e (10) Presença de aves silvestres (Gráfico 5).

Geralmente a aplicação prática dos conceitos de biossegurança é muito variável e até mesmo esporádica. Racicot et al. (2012a) concluíram que auditorias bimestrais não impactaram em mudanças comportamentais relativas à aplicação das medidas de biossegurança. A presença de câmeras influenciou na troca de calçados e no respeito da delimitação da área suja e área limpa a curto prazo sendo que, após 6 meses, o comprometimento dos trabalhadores da granja com a biossegurança declinou novamente, evidenciando a importância de serem medidas duradouras e não pontuais.

A própria infraestrutura pode influenciar ou até mesmo encorajar os trabalhadores a aplicar os conceitos de biossegurança, pois tornam as ações mais lógicas e práticas; sendo que o número de galpões por granja pode influenciar no maior ou menor comprometimento dos criadores dos animais com a biossegurança, o que pode estar relacionado ao aumento da preocupação da transmissão de doenças entre os galpões (RACICOT et al., 2012b). Na medicina humana, o aumento da acessibilidade nos lavatórios em uma unidade de terapia intensiva (UTI), aumentou o comprometimento em lavar as mãos de 32% para 45% (GRAHAM, 1990).

A inspeção diária dos lotes para coleta e descarte correto de aves mortas é importante considerando que a decomposição das carcaças no galpão aumenta o risco de propagação de doenças por roedores e insetos (CUNNINGHAM; FAIRCHILD, 2012). Calçamentos como cimento e asfalto também desencorajam a permanência de roedores nas granjas. Como medida profilática, pode-se calçar uma faixa de extensão entre 5 e 10 metros ao redor de cada galpão (SIEWERDT, 2005).

Em geral, as questões relacionadas ao armazenamento e descarte de esterco, uma importante fonte de agentes causadores de doenças, mostraram pouca concordância entre o que se diz que é realizado e o que é feito na prática (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997). Pouca atenção também é dada para veículos de transporte e o trânsito de pessoas nos locais (VAN STEENWINKEL et al., 2011).

O uso de calçados específicos para entrada nos galpões é recomendado a fim de evitar que as solas atuem na transmissão mecânica de microrganismos (VAN DE GIESSEN et al., 1996; HALD; WEDDERKOPP; MADSEN, 2000). O uso de propés de plástico descartáveis mostrou ser mais efetivo na delimitação de área limpa e área suja quando comparado à troca de calçado, devido a facilidade na remoção. Além disso, a troca de calçados pode favorecer a contaminação cruzada na hora de remoção dos mesmos (RACICOT et al., 2012a). O uso de propés de plástico pode ser uma boa alternativa para delimitação das áreas sujas e limpas (AMASS et al., 2000). A falta de uma barreira de higiene (ex. para troca de botas) foi identificada como principal fator de contaminação por *Campylobacter* em granjas de frango de corte na Dinamarca. Outros fatores de risco encontrados foram a presença de animais nas proximidades das granjas e período de vazio sanitário inferior a 14 dias (HALD; WEDDERKOPP; MADSEN, 2000).

O trabalho possui algumas limitações, sendo realizado em vinte granjas (171 lotes correspondentes a 2018) de uma única integração, de acordo com a concordância dos integrados e a disponibilidade dos dados. Algumas vezes os produtores tendem a responder de acordo com as diretrizes da empresa e não de acordo com a realidade (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997). Um dos itens críticos que, devido a uma análise pontual não pode ser conferido de forma completa é o plano de limpeza e desinfecção após a saída do lote. Como parte de uma limpeza eficaz, pisos, alimentadores e bebedouros devem ser lavados e desinfetados. Os exaustores e a sala de entrada devem ser desinfetados e as linhas de água cloradas (NESPECA; VAILLANCOURT; MORGAN MORROW, 1997). Neste contexto, outras informações importantes como o processo de limpeza (retirada inicial da matéria orgânica previamente a lavagem), tipo, diluição e duração da ação dos desinfetantes, não puderam ser avaliadas. No entanto, o *check list* de biossegurança é uma ferramenta para conscientização e avaliação dos principais pontos críticos a serem implementados em cada localidade, sendo uma análise de risco inicial.

6 CONCLUSÕES

Não foram encontradas correlações diretas entre os escores de biossegurança e IEP, prevalência de *Salmonella* spp. e uso de antimicrobianos, apenas entre escore de biossegurança e Ganho de Peso Médio das fêmeas, o que indica que outros fatores como ambiência e manejo, por exemplo, têm influência direta nestes parâmetros produtivos e sanitários, ademais da biossegurança.

As médias de mortalidade final e prevalência de *Salmonella* spp. foram maiores em lotes que utilizaram antibióticos quando comparadas aos lotes que não utilizaram antibióticos.

O *check list* de biossegurança pode ser uma ferramenta para auxiliar na identificação inicial de riscos, sendo apontadas algumas oportunidades de melhoria nestas práticas nos sistemas de produção avaliados.

**CAPÍTULO II: MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE RESISTÊNCIA À
COLISTINA EM *Escherichia coli* DE ORIGEM AVIÁRIA**

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SAÚDE ÚNICA

O conceito de Saúde Única (“One Health”) envolve esforços locais, nacionais e globais visando à saúde ideal de pessoas, animais e do meio ambiente (AVMA, 2008). O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos utilizados na medicina veterinária e a transferência horizontal de genes de resistência entre as espécies representam uma ameaça à Saúde Pública. Sabe-se que a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e genes que conferem esta resistência pode ocorrer por inúmeras vias, incluindo águas residuais, adubação com esterco, rotas migratórias de animais silvestres, viagens, troca direta entre humanos e animais e exposição a alimentos (VAN BOECKEL et al., 2015). Estima-se que a mortalidade anual por infecções bacterianas causadas por microrganismos multirresistentes afete 10 milhões de pessoas em 2050, se não forem adotadas medidas de uso prudente (O’NEILL, 2016). Este cenário apocalíptico alerta que infecções humanas por bactérias multirresistentes acarretam um alto impacto na vida do indivíduo, seus contatos próximos e na sociedade.

A resistência aos antimicrobianos é uma questão que sintetiza os conceitos de Saúde Única (ROBINSON et al., 2016). Considerando o estado atual de aumento da resistência a antimicrobianos, aliado à escassez de pesquisas de novos antibióticos pelas indústrias farmacêuticas, é necessário explorar todas as opções que permitam a preservação do atual arsenal antimicrobiano (EMEA; ECDC, 2009), visando a saúde de humanos, animais e preservação do ambiente.

O uso prudente de antibióticos é abordado constantemente por órgãos governamentais, pela mídia e por grandes redes de *fast food*, sendo uma necessidade imediata e de responsabilidade de todos os setores. Uma numerosa sequência de eventos precisa ocorrer para a resistência antimicrobiana existente nas granjas se disseminar aos consumidores através do manuseio ou consumo de alimentos e os riscos são incertos para a maioria destes eventos. Identificar os mecanismos de disseminação dos genes de resistência a antibióticos no ambiente de produção de frango de corte, facilita o desenvolvimento de medidas efetivas de mitigação (HE et al., 2014).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a quinta revisão dos antimicrobianos criticamente importantes na medicina humana, classificando as classes de antimicrobianos com base em dois critérios (WHO, 2017):

Critério I: “ser a única, ou uma das únicas limitadas terapias disponíveis, para tratar infecções bacterianas graves em pessoas.”

Critério II: “estas infecções devem ser transmitidas para humanos de fontes não humanas” ou “ter potencial de adquirir genes de resistência de fontes não humanas”.

Assim, se o antibiótico pertence a uma classe de antimicrobianos que obedece aos dois critérios ele é classificado como “Criticamente Importante”. Nesta classificação ainda há uma subcategoria, de antimicrobianos considerados “Prioridade Máxima”, que são os que tem adicionalmente “alta frequência de uso”, “alta proporção de uso em pacientes com infecções sérias nos centros de cuidado a saúde” ou usados para “tratar infecções em pessoas onde há evidência de transmissão de bactérias resistentes ou genes de resistência de fontes não humanas”. O grupo de antimicrobianos que seguem um ou outro critério, mas não ambos, é denominado “Altamente importante”; os que não seguem nenhum dos dois critérios mas ainda assim são usados na medicina humana são denominados “Importantes” e a categoria onde não tem seu uso aplicado em humanos é classificada como “Atualmente não usado em humanos (Não classificados)” (Quadro 1).

Apesar da Organização Mundial da Saúde incentivar que cada país e região crie suas próprias listas de importância dos antimicrobianos na medicina humana baseado no uso dos princípios ativos na área, estas classificações gerais são as diretrizes dos atuais guias de uso prudente de antibióticos em animais (WHO, 2017), norteando o uso prudente e responsável dos mesmos.

Neste contexto, colistina é classificada no grupo dos antimicrobianos de maior prioridade dentro da definição de antibióticos “Criticamente Importantes” para humanos (WHO, 2017). O gene *mcr-1*, um dos determinantes da resistência horizontal à colistina, foi encontrado em plasmídeos semelhantes nas mesmas espécies de bactérias isoladas de animais de produção, alimentos, humanos e meio ambiente, sugerindo uma possível transmissão entre estes segmentos (EMA, 2016). A observação de resistência a colistina em humanos, sem uma exposição prévia e este antibiótico é uma preocupação atual (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016).

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos utilizados na medicina humana segundo a Organização Mundial da Saúde

Criticamente importantes	Altamente importantes	Importantes	Não classificados
Aminoglicosídeos	Amdinopenicilinas	Aminociclitol	Aminocumarinos
Ansamícinas	Anfenicóis	Polipeptídeos cíclicos	Ortosomicinas
Carbapenemo e outros penemos	Cefalosporinas (1ª e 2ª geração)	Nitrofurantoínas	Fosfoglicolipídeos
Cefalosporinas (3ª, 4ª e 5ª geração)*	Lincosamidas	Nitroimidazoles	Poliéteres/ Ionóforos
Glicopeptídeos*	Penicilinas (anti-estafilocócica)	Pleuromutilinas	Quinoxalinas
Gliciliclinas	Ácidos Pseudomônicos		
Lipopeptídeos	Riminocefazinas		
Macrolídeos e cetolídeos*	Antibacterianos esteróides		
Monobactâmicos	Streptograminas		
Oxazolidinonas	Sulfonamidas		
Penicilinas	Sulfonas		
Derivados do ácido fosfônico	Tetraciclina		
Polimixinas (colistina)*			
Quinolonas*			
Drogas para tuberculose e micobactérias			

Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Legenda: *Classes priorizadas dentre aquelas definidas como criticamente importantes à medicina humana (HPCIA - Highest Priority Critically Important Antimicrobials).

Em Dezembro de 2014 o Comitê dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP) recomendou a restrição das indicações do uso de colistina para o tratamento de infecções entéricas suscetíveis e causadas somente por *E. coli* não invasivas, e que qualquer indicação de uso profilático deveria ser removida (EMA, 2016). O MAPA proibiu, através da Instrução Normativa 45 de 22 de Novembro de 2016, o uso de sulfato de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal (BRASIL, 2016), evidenciando as preocupações do uso deste medicamento no Brasil.

Em 2018, o Ministério da Saúde publicou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos do Brasil (PAN-BR), no âmbito da Saúde Única, com vigência de 2018 a 2022. O plano foi elaborado de acordo com os objetivos definidos pela aliança tripartite entre a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), e, dentre seus objetivos, é abordada a necessidade de aprimorar e ampliar o conhecimento sobre a resistência aos antimicrobianos por meio da realização de estudos científicos e de fomentar a implementação de práticas de manejo sanitário e de biossegurança para prevenção e controle de infecções na saúde animal (BRASIL, 2018).

A participação direta e indireta de animais, humanos e ambiente no desenvolvimento, transmissão e persistência de genes de resistência a antimicrobianos não é totalmente compreendida, mas, indubitavelmente, uma abordagem de Saúde Única deve ser implementada para lidar com esta questão (ROBINSON et al., 2016).

1.2 *ESCHERICHIA COLI* E RESISTÊNCIA À COLISTINA

A versatilidade e facilidade de isolamento fizeram da *Escherichia coli* um dos microrganismos exaustivamente mais estudados ao redor do mundo e, pesquisas recentes, revelaram a natureza complexa como patógeno e comensal (BLOUNT, 2015).

Escherichia coli é uma das principais habitantes do trato intestinal da maioria das espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos e aves; podendo ou não desencadear sintomatologia clínica (FAIRBROTHER; NADEAU, 2006).

Trata-se de uma bactéria da família Enterobacteriaceae, gram negativa, anaeróbia facultativa que, na maioria das vezes, fermenta lactose e hidrolisa triptofano a indol. As cepas de *E. coli* são frequentemente classificadas em sorotipos determinados pelos antígenos somático (O), capsular (K), flagelar (H) e pili (F) (BARNES et al., 2004).

Além de albergar diversos fatores de virulência, que ditam sua relação com o hospedeiro, esta bactéria também comporta diversos fatores de resistência a antibióticos, característica preocupante considerando sua ubiquidade (VILA et al., 2016).

Colistina é um agente antibacteriano da classe das polimixinas, polipeptídeos cíclicos produzidos naturalmente por *Bacillus (Paenibacillus) polymyxa*. Na medicina veterinária possui indicação terapêutica ou preventiva para infecções do trato gastrointestinal por bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* em diversos animais, incluindo suínos e aves (LANDMAN et al., 2008; EMA, 2016). Exemplificando, a colistina é utilizada extensivamente na produção de suínos, com foco no tratamento de diarreias pós desmame (CALLENIS et al., 2012) mas também para tratamento de colibacilose em aves (EMA, 2016), sendo comumente utilizada a via oral para administração.

Apesar de cinco polimixinas serem originalmente descritas (polimixina A a E), apenas a polimixina B e a polimixina E (colistina) apresentam importância clínica, diferindo uma da outra por um único aminoácido (substituição da D-leucina pela D-fenilalanina) (LANDMAN et al., 2008).

A propriedade antibiótica da colistina foi descoberta na década de 50 e, devido a importantes efeitos colaterais em seres humanos como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, o seu uso foi suspenso e reintroduzido na medicina humana nos

últimos anos, como alternativa terapêutica às bactérias gram negativas resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, às fluorquinolonas e aos aminoglicosídeos (LANDMAN et al., 2008).

As polimixinas possuem efeito detergente, são agentes catiônicos que se ligam a membrana externa aniônica da bactéria (lipopolissacarídeo (LPS)), afetando a integridade da mesma. Alterações no lipídeo A da membrana prejudicam esta ligação, conferindo assim resistência intrínseca ao antibiótico (LANDMAN et al., 2008; YAHAV et al., 2012).

Inicialmente a resistência a colistina era atribuída a mutações cromossômicas (LIU et al., 2016) através de modificações na camada externa de lipopolissacarídeos da bactéria por modificações no lipídeo A que ocorreriam após a ligação de 4-amino-4-deoxi-L arabinose (L-Ara4 N) no grupo fosfatado da molécula de lipídeo A (BREAZEALE; RIBEIRO; RAETZ, 2003), diminuindo assim a afinidade por colistina (KEMPF et al., 2013). Dois componentes são os responsáveis pela regulação deste sistema; PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ, além do regulador negativo *mgrB* em *Klebsiella pneumoniae* (GUNN, 2008; CANNATELLI et al., 2013; OLAITAN et al., 2014; POIREL et al., 2015).

No entanto, pesquisadores chineses notaram um instigante e repentino aumento em *E. coli* comensais de origem animal resistentes à colistina, suspeitando que mecanismos móveis poderiam estar envolvidos na transferência de genes de resistência a este antibiótico (LIU et al., 2016). Assim, em 2016, foi primeiramente reportado o mecanismo de resistência à polimixinas mediado por plasmídeo, o gene *mcr-1*, identificado em Enterobacteriaceae na China. Neste mesmo trabalho, detectou-se isolados de *E. coli* positivos para *mcr-1* em 78 (15%) de 523 amostras de carne de frango e suíno crua, 166 (21%) de 804 amostras de suínos e 13 (1,4%) de 902 amostras de pacientes internados com infecção. Importante ressaltar que o número de amostras carreadoras do gene *mcr-1* cresceu ano a ano (LIU et al., 2016). Em seguida, uma série de artigos foram publicados em diversas regiões do mundo, relativos ao encontro do gene *mcr-1* em animais, seres humanos e no meio ambiente (AL-TAWFIQ; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2017); demonstrando como a resistência a este antibiótico está caminhando a passos largos por meio da transferência horizontal de genes resistentes. É evidente que a significância de *Escherichia coli mcr-1+* nos animais de produção, no ambiente e em alimentos deve ser avaliada criteriosamente na perspectiva de segurança do alimento (BARLAAM et

al., 2019). Similarmente, animais de companhia também estão envolvidos na dinâmica de transmissão de bactérias *mcr-1* positivas, além com perfil de multirresistência, para seres humanos (ZHANG et al., 2016).

A administração de colistina em animais de produção pode levar à pressão seletiva de *E. coli mcr-1+* na microbiota intestinal e, conseqüentemente, favorecer a eliminação de bactérias resistentes nas fezes. Os dejetos e resíduos descartados incorretamente, tanto nas granjas quanto hospitais, também podem contaminar as águas residuais possibilitando a presença de *E. coli mcr-1+* no ambiente aquático. Assim, vegetais são contaminados quando esta água é destinada à irrigação. Resumidamente, seres humanos podem se infectar por *E. coli mcr-1+* por meio da manipulação ou consumo de carne crua ou malcozida provenientes de carcaças contaminadas, ingestão de vegetais contaminados ou, via contato direto na própria granja. O papel dos animais silvestres na seleção e disseminação de *E. coli mcr-1+* não foi elucidado (BARLAAM et al., 2019). A Figura 4 ilustra as possíveis rotas de transmissão de *Escherichia coli mcr-1+*.

Figura 4 - Principais vias de seleção e disseminação de *Escherichia coli mcr-1+* em animais, seres humanos e meio ambiente

Fonte: Adaptado de Baarlam et al. (2019).

Legenda: 1. granja; 2. frigorífico; 3. águas residuais; 4. ambiente (animais domésticos e silvestres); 5. intestino; 6. Instalações do hospital.

A prevalência de microrganismos carregando genes *mcr* na América Latina é maior em animais (8,7% - 118/1358) na comparação com amostras de alimentos (5,4% - 12/224) e humanos (2,0% - 340/16235), sendo que *E. coli* (95,8% - 527/550), *Klebsiella pneumoniae* (2,2% - 12/550) e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (0,7% - 4/550) foram as bactérias com maior frequência de aparecimento do gene (MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019).

Importante evidenciar que o primeiro isolado albergando o gene *mcr-1* remonta a década de 1980, segundo estudo retrospectivo de 1611 isolados de *E. coli* de granjas de frango, coincidindo com o período do primeiro uso desse antibiótico na China (SHEN et al., 2016).

Impressionantemente um dos plasmídeos identificados carreador do gene *mcr-1*, pHNSHP45 (IncI2), apresenta alta taxa de transferência *in vitro* entre cepas de *E. coli* e é capaz de migrar entre outras cepas de bactérias, como *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciando a facilidade da disseminação de resistência à colistina em patógenos humanos (LIU et al., 2016).

Isolados resistentes à colistina são esporadicamente encontrados em leitões com sintomatologia clínica, no entanto, a porcentagem de cepas de *Escherichia coli* resistentes à colistina, isoladas da microbiota de animais saudáveis, permanece abaixo de 1% (KEMPF et al., 2013). Fernandes et al. (2016) investigaram a resistência a colistina em 280 isolados Enterobacteriaceae de frangos saudáveis no Brasil, sendo o gene *mcr-1* detectado em 14 cepas de *E. coli* comensais originadas de granjas localizadas nos estados do Paraná (n=12), São Paulo (n=1) e Minas Gerais (n=1). A maioria (n=9) dos isolados *mcr-1* positivos também exibiam resistência a cefalosporinas humanas e/ou veterinárias, carregando genes ESBL (beta lactamase de amplo espectro) *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-8 e/ou *bla*CTX-M-15. Todos os carreadores do gene *mcr-1* pertenceram a grupos filogenéticos de *Escherichia coli* de baixa virulência (A e B1).

Até o final de 2016, o gene *mcr-1* foi encontrado entre isolados humanos em 29 países, relacionados a amostras ambientais em 4 países, e em animais, dentre eles os destinados a fins produtivos, em 28 países (AL-TAWFIQ; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2017).

Dados de sequenciamento demonstraram a presença do gene *mcr-1* em diferentes plasmídeos, incluindo IncI2, IncHI1, IncP, IncX4 e IncHI2 (ZHI et al., 2016).

O *mcr-1* é principalmente encontrado nos plasmídeos IncI2 e IncX4 (WANG et al., 2018).

O *mcr-1* está localizado em plasmídeos que podem albergar mecanismos de resistência a outros antibióticos; o que evidencia que o uso prudente destes princípios ativos, no contexto da Saúde Única, é pertinente no caso da colistina e também de outros antibióticos rotineiramente utilizados (AL-TAWFIQ; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2017). A transferência horizontal de genes de resistência para Enterobacteriaceae, tornando-as multirresistentes, pode seriamente comprometer as opções atuais de tratamento às infecções (FALGENHAUER et al., 2016).

O primeiro gene *mcr-1* descoberto estava localizado em dois plasmídeos, o pHNSHP45 (IncI2) originalmente reportado (Li, 2016) e no pHNSHP45-2 (IncHI2), o qual também continha genes que conferem resistência a antibióticos criticamente importantes para a medicina humana, como cefalosporina (*bla*CTX-M-14) e fosfomicina (*fosA3*) (ZHI et al., 2016).

A presença do *mcr-1* foi encontrada em isolados de suínos e humanos produtores de β -lactamase de amplo espectro que carregavam *bla*CTX-M-1 e, concomitante, o isolado humano também portador do gene carbapenemase *bla*KPC-2; conferindo assim resistência adicional às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos (FALGENHAUER et al., 2016). Delgado-Blas et al. (2016) reportaram uma cepa de *E. coli* positiva para *mcr-1* e que também abrigava *bla*NDM-1, revelando a coexistência da resistência a colistina e carbapenêmicos em um mesmo isolado humano com perfil definido de multirresistência a outros antibióticos.

O uso de antibióticos promotores de crescimento pode selecionar microrganismos resistentes a estes compostos e, posteriormente, há a possibilidade da transferência dessas bactérias para os criadores através do contato direto com os animais ou pelo ambiente (KATSUNUMA et al., 2007). Embora a prevalência do gene *mcr-1* seja considerada muito baixa em isolados de animais saudáveis, Lim et al. (2016) reportaram o encontro desse gene em amostras fecais de frangos que não apresentavam sintomatologia clínica. A epidemiologia da resistência à colistina ainda é pouco entendida (KEMPF et al., 2013). A transferência *in vitro* do *mcr-1* foi evidente mesmo sem a seleção de colistina, sendo que o gene *mcr-1* se manteve em *Escherichia coli* após seis passagens (equivalente a 60 gerações), indicando que as características de resistência podem se perpetuar por muito tempo mesmo com a retirada do antibiótico (YASSIN et al., 2017).

Há uma associação entre o uso de colistina como promotor de crescimento e a ocorrência de *E. coli* resistente a colistina no intestino dos animais. Estudo no Japão encontrou 3,4% de *Escherichia coli* resistente a colistina em isolados de frango de corte que utilizaram o antibiótico em subdoses e uma prevalência de 11,2% a 81,4% em granjas de suínos que usaram colistina em altas doses. Interessantemente não foram encontradas bactérias resistentes a este antibiótico em granjas avícolas que não usaram a colistina, mas foram recuperadas *E. coli* com perfil de resistência em duas granjas suínas que também não usaram esta polimixina, com frequência de 17,8% e 41,4% respectivamente (KATSUNUMA et al., 2007). Estes resultados sugerem que as fazendas de suinocultura investigada estavam contaminadas de uma forma abrangente com *E. coli* resistentes à colistina (KATSUNUMA et al., 2007), ou que o perfil de resistência pode ser algo duradouro, e que o uso do antibiótico no passado ainda se reflete por um longo período de tempo. Ou seja, as resistências aos antibióticos podem ser estáveis mesmo na ausência de pressão de seleção destes compostos (SANDER et al., 2002).

A composição de antígenos O na camada de LPS é um ponto importante a se considerar na suscetibilidade de colistina sendo que, como exemplo, diferentes sorovares de *Salmonella* apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) diversas de acordo com a sua composição. *Salmonellas* pertencentes aos sorovares Dublin e Enteritidis (ambas O: 1, 9 12), por exemplo, foram menos suscetíveis que os demais sorovares pesquisados (AGERSØ et al., 2012).

Kempf et al. (2013) encontraram em estudo retrospectivo uma maior porcentagem de bactérias resistentes a colistina quando este antibiótico era frequentemente utilizado. No entanto, diversos mecanismos contribuem para a estabilidade da resistência antibiótica nas populações bacteriana e, genes de resistência a antibióticos podem persistir no ambiente mesmo na ausência da pressão de seleção do antibiótico em questão (ANDERSSON; HUGHES, 2011).

As concentrações inibitórias mínimas e, respectivamente os pontos de corte para determinação da sensibilidade, variam muito para as polimixinas; assim a detecção molecular é o padrão ouro para detecção do gene *mcr-1* (RAPOPORT et al., 2016).

Em humanos, a primeira detecção do gene *mcr-1* foi na Argentina, em 9 isolados de *Escherichia coli* de pacientes em hospitais, quais também apresentavam

perfil de resistência a outros antibióticos. Em cinco pacientes, isolados de *E. coli mcr-1+* foram associados com infecções severas (RAPOPORT et al., 2016).

Em seguida a descoberta do gene *mcr-1*, Xavier et al. (2016) identificaram uma variante hospedada em um plasmídeo IncX4, o gene *mcr-2*, em cepas de *Escherichia coli* oriundas de suínos e bovinos na Bélgica; apresentando 76,7% de similaridade de nucleotídeos com *mcr-1*. A prevalência do gene *mcr-2* em *E. coli* de suínos resistentes a colistina foi maior quando comparada a prevalência de *mcr-1* (XAVIER et al., 2016). Em relação a frangos de corte, foi detectado o gene *mcr-1* em 85% (11/13) dos isolados de *E. coli* que apresentaram característica fenotípica de resistência a colistina (8,7% - 11/126) mas o gene *mcr-2* não foi identificado nestas amostras de aves (VOUNBA et al., 2019).

A prevalência do gene *mcr-1* em suínos (79,2% - 1152/1454) é significativamente maior que em frangos de corte (31,8% - 477/1498) na China; da mesma forma que o gene *mcr-2*, encontrado em 56,3% (818/1454) em suínos e apenas em 5,5% (82/1498) em frangos de corte (ZHANG et al., 2018).

Já em 2017 foi relatado o gene *mcr-3*, detectado m *Escherichia coli* provenientes de suínos na China. Esta terceira variante mostrou similaridades na sequência nucleotídica de 45% e 47% ao *mcr-1* e ao *mcr-2*, respectivamente (YIN et al., 2017).

O gene *mcr-3* também foi reportado na Dinamarca, em um paciente hospitalizado que viajou para Tailândia (ROER et al., 2017) e na Espanha, em *E. coli* recuperada de bovinos (HERNÁNDEZ et al., 2017). Belayhene et al. (2018) relataram a presença dos genes *mcr-1* (3/9 - 33%) e *mcr-3* (2/9 - 22%) em cepas de *E. coli* resistentes à colistina (9/636 - 1,4%) isoladas de animais saudáveis na Coreia do Sul. Adicionalmente, todos os isolados que albergavam os genes *mcr* eram provenientes de suínos e apresentavam característica de multirresistência. A prevalência do gene *mcr-3* na China também foi maior em *E. coli* de suínos (18,7% - 272/1454) quando comparada a frangos de corte (5,2% - 78/1498). No total, apenas 3 amostras de frango de corte foram positivas para os três genes (*mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-3*), enquanto 173 amostras de suínos apresentaram esta característica; as prevalências dos *mcr* estudados também foram significativamente maiores nos suabes da orofaringe/nasais do que nos suabes cloacais/anais, direcionando o local da coleta para amostragem (ZHANG et al., 2018).

A condução de estudos filogenéticos identificou mais 33 novas variantes de *mcr-2* e 12 novas variantes de *mcr-3* (ZHANG et al., 2018), evidenciando que a transferência horizontal de resistência para colistina pode ser ainda mais complexa.

O próximo gene identificado foi o *mcr-4* em uma cepa de *Salmonella* enterica monofásica variante do sorovar Typhimurium em um suíno na Itália e em cepas de *Escherichia coli* coletadas de suínos apresentando diarreia pós desmame provenientes da Espanha e Bélgica (CARATTOLI et al., 2017). O *mcr-4* também foi detectado em *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium isoladas de amostras fecais humanas (CARRETTO et al., 2018).

Subsequentemente, uma nova fosfoetanolamina transferase nomeada *mcr-5* foi identificada em *Salmonella* enterica subespécie enterica sorovar Paratyphi B de aves, carne de frango e ambiente, resistentes a colistina (CIM > 2mg/L) mas negativas para o *mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-3* (BOROWIAK et al., 2017). O gene também foi encontrado em *Escherichia coli* provenientes de suínos doentes e saudáveis no Japão (FUKUDA et al., 2018).

A prevalência de *mcr-4* e *mcr-5* foi significativamente maior em suabes de suínos (41,4% - 642/1552 e 33,1% - 514/1552, respectivamente) quando comparada aos suabes de frangos de corte (17,2% - 257/1498 e 9,9% - 148/1498, respectivamente) (CHEN et al., 2018).

Wang et al. (2018) caracterizaram o *mcr-8* em um plasmídeo do tipo IncFII em *Klebsiella pneumoniae* isolada de amostra fecal de suíno, apresentando CIM=16µg/ml para colistina e perfil de multirresistência; incluindo genes de resistência à β -lactâmicos (*bla*SHV-1 e *bla*CTX-M-14), à aminoglicosídeos (*strA*, *strB*, *armA*, e *aph*(4)-la), à macrolídeos (*mph*(E) e *msr*(E)), à quinolonas (*oqx*A e *qnr*B4), à sulfonamidas (*su*1, *su*2 e *su*3), à tetraciclina (*tet*(A), *tet*(B) e *tet*(34)) e ao trimetoprim (*dfr*A12). De forma preocupante, ao confrontarem um isolado clínico de um paciente humano com pneumonia em 2016, encontraram 99% de identidade com *mcr-8*, sugerindo que esse gene pode ter sido o responsável pela resistência a colistina dessa cepa.

O último gene de resistência para colistina reportado, até o momento, foi o *mcr-9* em uma *Salmonella* enterica sorotipo Typhimurium multirresistente, de um paciente humano. Uma comparação pareada dos nove *mcr* homólogos (*mcr-1* até *mcr-9*) revelaram que o *mcr-9*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-7* compartilham um alto grau de similaridade estrutural (CARROLL et al., 2019).

Até o momento, poucos dos novos genes *mcr* já descritos neste curto intervalo de tempo foram identificados no Brasil. Uma revisão contemplando 48 estudos, resultando em 18705 isolados recuperados de 2000 a 2018, demonstraram que a frequência total de genes *mcr* na América Latina era de 2,9% (550/18705), com o plasmídeo IncX4 sendo o principal responsável pela disseminação destes genes no continente. Adicionalmente, apenas o Brasil (*mcr*-3; 0,41% - 1/246) e a Colômbia (*mcr*-5; 0,57% - 1/174) apresentaram genes *mcr* além do amplamente descrito *mcr*-1, sendo o maior número de isolados *mcr*+ identificados nestes países e na Argentina, na qual também identificou a variante *mcr*-1.5 (MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019). Um variante, o *mcr* 4.3, foi descoberto recentemente em uma cepa de *Acinetobacter baumannii* isolada em 2008 no Brasil, de um humano com meningite, na qual apresentava CIM de 64 mg/L (MARTINS-SORENSEN et al., 2019).

A descoberta dos genes subsequentes ao *mcr*-1 ainda não foi relatada em amostras de *Escherichia coli* oriundas de amostras de frango de corte no Brasil. Considerando a natureza do uso veterinário da colistina, as características do mecanismo de resistência recentemente identificados e a oportunidade de co-seleção deste antibiótico, é sugestivo de que a resistência à colistina tem potencial de se espalhar rapidamente e estar associada a organismos multirresistentes que podem ser transferidos para seres humanos, por exemplo, através do contato com animais, manipulação e consumo de alimentos de origem animal (EMA, 2016).

2 OBJETIVOS

Devido ao atual interesse científico na pesquisa de genes de resistência plasmidiais (*mcr*) para colistina, e no contexto de saúde única, o objetivo deste trabalho foi avaliar o fenótipo de resistência à colistina em *Escherichia coli* isoladas de fezes de frango de corte do Sudeste do Brasil e pesquisar a presença dos genes de virulência *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nestas estirpes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram contatadas 4 (quatro) integrações de frango de corte localizadas na região sudeste do Brasil (São Paulo e Minas Gerais). As integrações de tamanho médio (abate aproximado de 100.000 a 150.000 aves/dia) foram escolhidas por conveniência de acordo com a disponibilidade em compartilhamento de dados e localização. Destas integrações foram selecionados de forma aleatória 20 (vinte) galpões em cada uma delas e coletadas amostras de fezes de 5 (cinco) aves por galpão, totalizando 400 amostras.

As amostras de fezes foram coletadas com auxílio de suabes estéreis (Figura 5) e transportados refrigerados até o laboratório.

Figura 5 - Coleta de fezes frescas diretamente da cama do aviário com auxílio de suabes estéreis

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Ao todo, quatrocentas amostras foram processadas no Laboratório de Medicina Aviária da FMVZ-USP. O cultivo foi realizado em caldo BHI, seguido de plaqueamento em ágar MacConkey a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas (Figura 6). Uma colônia por placa, com características fenotípicas de *Escherichia coli*, foi selecionada, estocada em meio de estoque Lúria Bertani e submetidas identificação pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) (KUHNERT et al., 2012).

Figura 6 - Seleção de colônia de *Escherichia coli* isolada em ágar MacConkey

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

3.3 MICROMÉTODO DE ELUIÇÃO DE DISCO

A microdiluição em caldo é considerada a referência padrão para testes de suscetibilidade à colistina (AL-TAWFIQ; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2017). Para mensurar a atividade *in vitro* da colistina utilizou-se o micrométodo de eluição de disco de colistina (LNR, 2017). Este método é fundamentado na eluição dos discos de colistina em 3 diferentes concentrações (1, 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$) em caldo de Müller Hilton ajustado em cátions e adição do inóculo bacteriano preparado a partir da cultura pura em uma turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas. O resultado é considerado resistente quando a CIM (Concentração Inibitória Mínima) é $\geq 2 \mu\text{g/mL}$.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras previamente identificadas como *Escherichia coli* foram submetidas à extração de DNA segundo a metodologia descrita por Boom et al. (1990).

3.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA AÇÃO DA POLIMERASE

Após a extração, pares de *primers* foram utilizados na pesquisa dos genes *mcr-1* e *mcr-2* em todas as amostras, de acordo com a metodologia descrita por Fernandes et al. (2016) e Xavier et al (2016). Para as amostras com fenótipo de resistência a colistina foram investigados a presença dos genes *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* em reação de PCR multiplex (Quadro 2) (CARATTOLI et al., 2017; CUNHA, 2018).

Como controles positivos foram utilizadas as estirpes IT5/35 (*mcr-1*), ETEC 895 (*mcr-3*) e APEC 153 (*mcr-5*).

A mistura para a amplificação foi constituída por água ultra-pura; MgCl₂; buffer Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM; trifosfatos de desoxinucleotídeos 200 µM (dNTP's); *primers* de interesse; Taq DNA polimerase 0,5U e DNA bacteriano; em um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories) programado para um ciclo a 94°C por 4 minutos, 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para os genes *mcr-1* e *mcr-2* e, programado para um ciclo a 94°C por 5 minutos, 27 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para identificação dos genes *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*.

Os produtos da amplificação foram separados na eletroforese em um gel de agarose 1,5% corado com 1,5µL de UniSafe Dye, utilizando tampão TBE 0,5x (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1mM, pH 8), com corrida de 100 V por 60 minutos. Os fragmentos amplificados foram corados com Loading Buffer™ (LGC Biotecnologia) e analisados no fotodocumentador Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100-bp DNA Ladder™ (New England BioLabs Inc).

Quadro 2 – Descrição da sequência dos *primers* e tamanho dos produtos amplificados, utilizados na identificação dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*

Alvo	Primer	Sequência	Produto	Referência
Gene <i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i> - Fw	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	1315	(FERNANDES et al., 2016)
	<i>mcr-1</i> - Rv	CTTGGTCGGTCTGTAGGG		
Gene <i>mcr-2</i>	<i>mcr-2</i> - Fw	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	567	(XAVIER et al., 2016)
	<i>mcr-2</i> - Rv	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG		
Gene <i>mcr-3</i>	<i>mcr-3</i> - Fw	TGATGATGCAAAACGGGATAC	603	(CUNHA, 2018)
	<i>mcr-3</i> - Rv	TTGTCATAGGTGTTGGTGAGC		
Gene <i>mcr-4</i>	<i>mcr-4</i> - Fw	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT	487	(CARATTOLI et al., 2017)
	<i>mcr-4</i> - Rv	TTACAGCCAGAATCATTATCA		
Gene <i>mcr-5</i>	<i>mcr-5</i> - Fw	TCGCTATTTGATCACTCCTG	856	(CUNHA, 2018)
	<i>mcr-5</i> - Rv	GATGACGTAAGGTATGCCAT		

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

3.6 ANTIBIOGRAMA

Foi realizado o antibiograma pelo método de difusão em disco para as amostras que apresentaram resistência à colistina no teste fenotípico, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para bactérias de origem humana e veterinária (CLSI, 2012). Uma colônia isolada do ágar MacConkey foi diluída em 500µL de caldo Müller Hilton e, com auxílio de suabe estéril, plaqueada na superfície do ágar Müller Hilton. Os discos dos antibióticos foram posicionados e inseridos com auxílio de uma pinça estéril.

Os antibióticos analisados e suas respectivas concentrações foram: Amicacina (AMI) - 30 µg, Cotrimoxazol (SUT) - 25µg, Gentamicina (GEN) - 10 µg, Ceftiofur (CTF) - 30 µg, Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC) - 20/10 µg, Cefoxitina (CFO) - 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) - 5 µg, Ácido Nalidíxico (NAL) - 30 µg e Tetraciclina (TET) - 30 µg.

O padrão de interpretação dos resultados para considerar o resultado resistente (R) através do tamanho do halo (mm) foi: ≤ 14mm para amicacina, ≤ 10mm para cotrimoxazol, ≤ 6mm para gentamicina, ≤ 17mm para ceftiofur, ≤ 13mm amoxicilina/ácido clavulânico, ≤ 14mm para cefoxitina, ≤ 15mm para ciprofloxacina, ≤

13mm para ácido nalidíxico e ≤ 14 mm para tetraciclina, de acordo com fabricante (CEFAR Diagnóstica).

As placas foram incubadas na estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e a leitura realizada após 18-24 horas.

Foram considerados multirresistentes os isolados que apresentaram resistência a um ou mais antibióticos pertencentes a três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

4 RESULTADOS

Dentre as quatro integrações avaliadas foi encontrado um total de 2,3% (9/389) de estirpes resistentes à colistina no micrométodo de eluição de disco. As Integrações 1, 2, 3 e 4 apresentaram 1,1% (1/92), 4,0% (4/99), 2,0% (2/99) e 2,0% (2/99) das estirpes resistentes ao antibiótico, respectivamente. Na integração 2 foram encontradas 2 estirpes (RG206-L3 e RG206-L5) resistentes em um mesmo galpão (40% - 2/5). A Figura 7 ilustra o teste de eluição de disco da colistina e a Tabela 2 mostra os resultados da Concentração Inibitória Mínima e a respectiva classificação das estirpes em sensível ou resistente.

Figura 7 - Estirpes de *Escherichia coli* sensíveis à colistina (esquerda) e resistentes à colistina (direita) analisadas pelo micrométodo de eluição de disco

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Tabela 2 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima de colistina para *Escherichia coli* isoladas de fezes de frangos de corte

Integração	Tamanho da amostra (n)	Amostras + para <i>E. coli</i>	Sensível < 2 µg/ml	Resistente ≥ 4 µg/ml	Uso de colistina nos últimos 6 lotes
Integração 1	100	92/100	91/92 (98,9%)	1/92 (1,1%)	Não
Integração 2	100	99/100	95/99 (96,0%)	4/99 (4,0%)	Sim
Integração 3	100	99/100	97/99 (98,0%)	2/99 (2,0%)	Não
Integração 4	100	99/100	97/99 (98,0%)	2/99 (2,0%)	Não
Total	400	389/400	381/390 (97,7%)	9/389 (2,3%)	-

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Das nove amostras com característica fenotípica de resistência à colistina, quatro delas (RG197-T4, RG206-R1, RG226-D5 e RG255-K4) apresentaram Concentração Inibitória Mínima ≥ 2 µg/mL e cinco delas (RG206-L3, RG206-L5, RG206-S3, RG226-M4 e RG255-H5) Concentração Inibitória Mínima de ≥ 4 µg/mL.

A Tabela 3 demonstra a sensibilidade dos isolados resistentes à colistina aos demais antibióticos comumente utilizados na produção animal.

Dos isolados que apresentaram característica fenotípica de resistência à colistina (9/389 – 2,3%); 44,4% (4/9) apresentaram característica de multirresistência, sendo resistentes à ≥ 3 classes de antibióticos. O antibiótico que teve a maior frequência de isolados resistentes foi o ácido nalidíxico (44,4%), seguido da ciprofloxacina (22,2%) e ceftiofur (11,1%), gentamicina (11,1%) e sulfametoxazol com trimetoprim (cefoxitina) (11,1%). O RG206-S3 também apresentou fenótipo de resistência estendida aos betalactâmicos, visualizado na Figura 8.

Tabela 3. Sensibilidade a outros antibióticos dos isolados de *Escherichia coli* com característica fenotípica de resistência à colistina

Amostra	COL	AMC	AMI	CIP	CFO	CTF	GEN	NAL	SUT	TET
RG197-T4	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
RG206-L3	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
RG206-L5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RG206-R1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RG206-S3	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
RG226-D5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RG226-M4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RG255-H5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RG255-K4	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Total R	9/9 (100%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	2/9 (22,2%)	0/9 (0%)	(1/9) (11,1%)	1/9 (11,1%)	4/9 (44,4%)	1/9 (11,1%)	3/9 (33,3%)

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Legenda: Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC), Amicacina (AMI), Ciprofloxacina (CIP), Cefoxitina (CFO), Ceftiofur (CTF), Colistina (COL), Gentamicina (GEN), Ácido Nalidíxico (NAL), Cotrimoxazol – Sulfametoxazol/Trimetoprim (SUT) e Tetraciclina (TET). R – resistente, S – sensível.

Figura 8 - Isolado de *Escherichia coli* apresentando produção de β -lactamase (formato da junção entre ácido clavulânico (AMC) e ceftiofur (CFT))

Fonte: Reple, J.N. (Dissertação, 2020).

Os genes *mcr-1* e *mcr-2* não foram identificados em nenhuma das amostras avaliadas (0% - 0/389) sendo que, os genes *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* também não foram detectados nas amostras com fenótipo resistente à colistina (0% - 0/9).

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram uma baixa frequência de ocorrência de *Escherichia coli* resistente à colistina nas quatro integrações de frangos de corte (2,3%) do Sudeste brasileiro, e estão de acordo com outros resultados obtidos no Brasil (CORRÊA, 2013; CASELLA, 2016; FERNANDES et al., 2016; CUNHA, 2018) e em demais países ao redor do mundo (KATSUNUMA et al., 2007; GALES; JONES; SADER, 2011; KEMPF et al., 2013; LIM et al., 2016).

Em um estudo em larga escala de 15.000 isolados humanos de bactérias gram-negativas, provenientes de diferentes continentes entre os anos 2006-2009, foram encontrados apenas 0,2% de *Escherichia coli* resistentes a colistina (GALES; JONES; SADER, 2011). Concomitantemente, os resultados coincidem com os achados de Corrêa (2013) que obtiveram 3,3% de amostras de *E. coli* de origem aviária resistentes à colistina, utilizando 20mg como ponto de corte. Lim et al. (2016) testaram 10576 *E. coli* de diversas origens sendo que apenas 1,46% (154/10576) exibiram resistência a colistina e, somente 1,2% (21/1687) das amostras provenientes de fezes de frango saudáveis foram resistentes a este antibiótico.

Em estudo que avaliou linhagens de *Escherichia coli* isoladas de suabes cloacais e carne de frango no Brasil e na França, não foi detectada resistência à colistina em nenhuma das linhagens analisadas por meio de disco difusão (CASELLA, 2016). Em avaliação sobre os índices de resistência à colistina na Europa, todas *E. coli* de origem aviária na Suécia (total de 181 amostras) foram sensíveis a este antibiótico em 2011 e, apenas 3% em um total de 140 amostras das *E. coli* provenientes de frango da Dinamarca foram resistentes, no mesmo ano (KEMPF et al., 2013).

Também não foram encontradas bactérias resistentes a colistina em granjas avícolas que não usaram o antibiótico no Japão porém, ao usar esta polimixina em subdoses como promotor de crescimento, a prevalência de *Escherichia coli* resistente a colistina foi de 3,4% (KATSUNUMA et al., 2007).

Isolados oriundos de animais doentes demonstram maior resistência quando comparado a amostras isoladas de animais saudáveis (LIM et al., 2016). As fezes do presente estudo foram coletadas de lotes saudáveis e sem tratamento com colistina no momento da coleta. Kempf et al. (2013) relataram que apesar do encontro esporádico de isolados resistentes à colistina em leitões doentes, a prevalência de

isolados da microbiota de animais saudáveis permanece abaixo de 1%, coincidindo com a baixa frequência encontrada na microbiota de frangos de corte saudáveis no presente estudo.

Há diferenças na utilização de colistina entre as quatro integrações, sendo que apenas a Integração 2 utilizou colistina nos últimos 6 lotes criados em cada granja. Observa-se que a prevalência de estirpes resistentes é maior na Integração 2 (4,0%) quando comparada às demais (1,1% - 2,0%), sugerindo uma pressão de seleção de bactérias resistentes à colistina. Katsunuma et al. (2007) também recuperaram *E. coli* com perfil de resistência em duas granjas suínas que não utilizaram colistina com frequência de 17,8% e 41,4% respectivamente. Estes dados podem indicar que a pressão de seleção exercida pelo antibiótico pode se perpetuar por longo tempo, ou seja, se reflete ainda em lotes subsequentes mesmo com a retirada do antibiótico (SANDER et al., 2002; ANDERSSON; HUGHES, 2011; YASSIN et al., 2017) ou, outra possibilidade, da transferência de bactérias e genes de resistência entre as granjas, através de falhas na biossegurança, por exemplo.

A baixa frequência de isolados resistentes a colistina pode ser explicada pelo uso esporádico deste antibiótico como tratamento na avicultura, cenário diferente da suinocultura que ainda utiliza o antibiótico como uma das principais opções terapêuticas em casos de colibacilose (CALLENS et al., 2012). Devido à importância clínica da colistina para humanos, este antimicrobiano foi banido como aditivo melhorador de desempenho em animais de produção (BRASIL, 2016).

Fernandes et al. (2016) encontraram o gene *mcr-1* em uma amostra de *E. coli* de suíno sensível à colistina (CIM=1mg/L), indicando que a presença do gene nem sempre garante a sua expressão. Por esta razão, os genes *mcr-1* e *mcr-2* foram investigados em todas as amostras isoladas neste estudo, não sendo detectado em nenhuma delas (0/389 – 0%).

Cunha (2018) encontrou 5,4% (41/773) de isolados de origem aviária positivos para *mcr-1* no Brasil isolados entre 2013 a 2017, não sendo detectado outros genes *mcr*. A maioria das estirpes positivas eram originárias de fezes de peru (38/41), sendo que apenas 2 dos isolados *mcr-1*+ foram provenientes de fezes de frangos de corte e de poedeiras no Sudeste do Brasil, com CIM variando de 2mg/L a 16 mg/L e 1 isolado de APEC. O gene *mcr* também não foi encontrado em amostras de carne de frango (0/176). Notoriamente foi encontrada uma alta prevalência de cepas positivas para *mcr-1* (33,8%) de isolados de *E. coli* de suínos, tanto em ETEC (47%), STEC (44,2%),

estirpes comensais (56,8%) e carne suína (2,3%), além da detecção do gene *mcr-3* dentre os isolados de ETEC de suínos.

Lim et al. (2016) identificaram o gene *mcr-1* mesmo em amostras fecais de frangos saudáveis apresentando resistência fenotípica de colistina (23,8% - 5/21), possivelmente devido ao alto consumo deste antibiótico na Coreia neste período.

A baixa prevalência de genes *mcr-1* no Sudeste do Brasil também foi relatada por Fernandes et al. (2016) com apenas 1 isolado positivo no estado de Minas Gerais e 1 isolado identificado no estado de São Paulo. A maioria das estirpes *mcr-1*+ detectadas pelos autores era proveniente de granjas do estado do Paraná (12 isolados), totalizando 5% (14/280) de estirpes *mcr-1*+ em frangos de corte no período de 2003 a 2015.

Os genes *mcr-1* e *mcr-2* também não foram detectados em amostras de *E. coli* com fenótipo de resistência à colistina (2/93 - 2,2%) no Senegal (VOUNBA et al., 2019). Interessantemente neste mesmo estudo, apesar de apenas 8,7% dos isolados provenientes do Vietnã apresentarem característica fenotípica de resistência à colistina, foi identificado o gene *mcr-1* na maior parte deles (11/13 – 85%), não sendo detectado o gene *mcr-2*. No Nepal foram encontradas 22,8% (27/118) amostras de *E. coli* resistentes à colistina, todas albergando o gene *mcr-1*, isoladas de suabes cloacais de aves de produção (JOSHI et al., 2019). O gene *mcr-2* foi encontrado em apenas 5,5% (82/1498) das amostras de fezes de frangos de corte (ZHANG et al., 2018) sendo que, até o momento, não foi identificado em amostras de aves no Brasil. Estes achados sugerem que cada região possui características epidemiológicas muito particulares que ditam a transferência horizontal ou vertical dos genes de resistência à colistina.

Ainda foram estudados a presença dos genes *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nas amostras que apresentaram resultado fenotípico de resistência para averiguar o envolvimento de outros genes. Nenhuma das amostras (0% - 0/9) apresentou os *mcr* investigados.

A prevalência do gene *mcr-3* em frangos de corte também foi baixa na China (5,2% - 78/1498) (ZHANG et al., 2018) e, no Brasil, este gene foi relatado apenas em poucos isolados provenientes de suínos (CUNHA, 2018; MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019).

Apesar dos genes *mcr-4* e *mcr-5* terem sido detectados na China em suabes de frangos de corte (17,2% - 257/1498 e 9,9% - 148/1498, respectivamente) (CHEN et al., 2018), até o momento não foram identificados no Brasil.

A descoberta de novos genes, como o *mcr-9* (CARROLL et al., 2019) e diversas variantes (ZHANG et al., 2018; MENDES OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019) ocorre de forma constante e acelerada, sendo que estes mecanismos não estudados no presente trabalho ou, ainda outros a serem descobertos, podem estar envolvidos na determinação da característica fenotípica encontrada nos isolados.

Ao avaliar a sensibilidade aos outros antibióticos das amostras resistentes à colistina (8/389 – 2,3%); 44,4% (4/9) apresentaram característica de multirresistência, sendo resistente a ≥ 3 classes de antibióticos. O antibiótico que teve a maior frequência de isolados resistentes foi o ácido nalidíxico (44,4%), seguido da ciprofloxacina (22,2%) e ceftiofur (11,1%), gentamicina (11,1%) e sulfametoxazol com trimetoprim (11,1%). O RG206-S3 também apresentou fenótipo de produção de β -lactamase, como visualizado na Figura 8.

No Brasil, grande parte dos isolados *mcr-1+* (n=9) também apresentaram resistência a cefalosporinas e carregavam os genes que conferem resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro (ESBL), *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-8 e/ou *bla*CTX-M-15 (FERNANDES et al., 2016). Isolados oriundos do Senegal e Vietnã, resistentes à colistina, também apresentaram característica fenotípica de multirresistência a outros antibióticos (VOUNBA et al., 2019).

Mais de 80% dos isolados de *Escherichia coli* do Nepal resistentes à colistina também apresentaram resistência à ciprofloxacina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim sendo que, 11,11 % (3/27) dos *mcr-1+* também eram produtores de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) (JOSHI et al., 2019). Na China, foi identificado o gene *mcr-1* em 9,8% (17/193) de bactérias originárias de amostras fecais de crianças não apresentando diarreia onde, 53% (9/17) dos isolados, também expressaram genes de β -lactamase espectro estendido (ESBL).

6 CONCLUSÕES

Foi encontrada uma baixa frequência de ocorrência de *Escherichia coli* resistente à colistina nas quatro integrações de aves (9/389 - 2,3%), possivelmente devido ao menor uso deste antibiótico em frangos de corte quando comparado a sua utilização na espécie suína.

A Integração 2 apresentou maior prevalência de estirpes resistentes (4,0%) quando comparada às demais (1,1% - 2,0%), sendo que esta Integração foi a única que utilizou colistina nos últimos 6 lotes nas granjas, indicando maior pressão de seleção do antibiótico.

Não foram identificados os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* nos isolados, sugerindo que a resistência à colistina pode ser de origem cromossômica ou através de outros *mcr* não identificados.

Estirpes com fenótipo de resistência à colistina (44,4%- 4/9) também foram resistentes a outros antibióticos de diferentes classes e, uma delas, também apresentou fenótipo de resistência estendida aos betalactâmicos.

Cada região possui características epidemiológicas particulares e a co-seleção de genes de resistência a outros antibióticos é um risco que deve ser constantemente avaliado, considerando a importância de determinados antibióticos na medicina humana, em uma abordagem de Saúde Única.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance : a personal view on changing patterns of risks , effects of interventions and the way forward. **Phil. Trans. R. Soc**, v. 370, 2015.
- ABREU, P. G. et al. Casca de arroz e palhada da soja como substrato para compostagem de carcaças de frangos de corte. **Circular Técnica 54, Embrapa**, p. 1–8, 2009.
- AGERSØ, Y. et al. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 367–369, 2012.
- AL-TAWFIQ, J. A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 77–84, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.415>>.
- AMASS, S. F. et al. Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. **Swine Health and Production**, v. 8, n. 4, p. 169–173, 2000.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 901–911, 2011.
- ARSENAULT, J. et al. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 81, n. 4, p. 250–264, 2007.
- AVMA - AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **One health: A new professional imperative**, 2008.
- BARLAAM, A. et al. Global Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Food Chains and Associated Food Safety Implications: A Review . **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 8, p. 1440–1448, 2019.
- BARREIRA, L. P.; JUNIOR, A. P.; RODRIGUES, M. S. Usinas de compostagem do estado de São Paulo: qualidade dos compostos e processos de produção. **Eng. Sanit. Ambient. Artigo Técnico**, v. 11, p. 385–393, 2006.
- BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of poultry**. 12.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 2008. p.631-656.
- BELAYNEHE, K. M. et al. Emergence of *mcr-1* and *mcr-3* variants coding for plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from food- producing animals in South Korea. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 22–24, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.011>>.

BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**, v. 4, p. 1–12, 2015.

BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

BOROWIAK, M. et al. 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. 3317–3324, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 56 de 04 de dezembro de 2007. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 6.dez.2007. Seção 1, p.11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 59 de 02 de dezembro de 2009. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 4. dez.2009. Seção 1, p.4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 36 de 06 de dezembro de 2012. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 7. dez.2012. Seção 1, p.25.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 45 de 22 de novembro de 2016. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30.nov.2016. Seção 1, p.06.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 08 de 17 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 3. mar.2017. Seção 1, p.32.

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

BREAZEALE, S. D.; RIBEIRO, A. A.; RAETZ, C. R. H. Origin of lipid a species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*: An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24731–24739, 2003.

BUCCI, V. et al. Social interaction, noise and antibiotic-mediated switches in the intestinal microbiota. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 4, 2012.

BURBARELLI, M. F. C. et al. The Effects of Two Different Cleaning and Disinfection Programs on Broiler Performance and Microbiological Status of Broiler Houses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. 4, p. 575–580, 2015.

CALLENS, B. et al. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 1, p. 53–62, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.03.001>>.

CANNATELLI, A. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5521–5526, 2013.

CARATTOLI, A. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, p. 1–8, 2017.

CARDONA, C. Poultry biosecurity evaluation and indicators. In: XXIV World Poultry Congress, **Anais**, Salvador, Bahia, Brazil, 2012.

CARRETTO, E. et al. Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, october to November 2016. **Euro Surveillance**, v. 23, n. 2, 2018.

CARROLL, L. M. et al. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistance, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 3, 2019.

CASELLA, T. **Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango**. 2016. 157f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.

CHEN, L. et al. Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. v. 32, 2012.

CONLY, J. M. et al. Handwashing practices in an intensive care unit: the effects of an educational program and its relationship to infection rates. **American Journal of Infection Control**, v. 17, p. 330–339, 1989.

CORRÊA, F. A. F. **Pesquisa de bactérias com determinação do perfil de sensibilidade em vísceras comestíveis de frango de corte, penas e camas de aviários**. 2013. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

COSBY, D. E. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, p. 408–426, 2015.

CUNHA, M. P. V. **Determinantes Emergentes de Resistência Antimicrobiana em *Escherichia coli* de Origem Clínica, Fecal e de Carne de Aves e Suínos**. 2018.

196f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

CUNNINGHAM, D. L.; FAIRCHILD, B. D. Biosecurity Basics for Poultry Growers. **The University of Georgia Cooperative Extension**, 2012.

DALE, E. L. et al. On farm prevention of *Campylobacter* and *Salmonella*: Lessons learned from basic biosecurity interventions. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 2, p. 222–232, 2015.

DAVIES, R. H. et al. Bacteriological and serological investigation of persistent *Salmonella* enteritidis infection in an integrated poultry organisation. **Veterinary Microbiology**, v. 58, n. 2–4, p. 277–293, 1997.

DELGADO-BLAS, J. F. et al. Coexistence of *mcr-1* and *bla*NDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. November, p. 6356–6358, 2016.

DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 1, p. 4554–4561, 2011.

DIXON, L. K.; SUN, H.; ROBERTS, H. African swine fever. **Antiviral Research**, v. 165, n. March, p. 34–41, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>>.

DUMAS, M. D. et al. Impacts of Poultry House Environment on Poultry Litter Bacterial Community Composition. **PlosOne**, v. 6, n. 9, p. 1–12, 2011.

DUTRA, M.C. **Uso de antimicrobianos em suinocultura no Brasil: análise crítica e impacto sobre marcadores epidemiológicos de resistência**. 2017. 92f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Updated advice on the use of Colistin within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. **EMA/231573/2016**, v. 44, p. 1–56, 2016. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/05/WC500207233.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.

EMEA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY); ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). **The bacterial challenge: Time to react - A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and development of new antibacterial agents**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2009/11/news_detail_000044.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1>. Acesso em: 17 dez. 2019.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É. *Escherichia coli*: On-farm contamination of

animals. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 25, n. 2, p. 555–569, 2006.

FALGENHAUER, L. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 282–283, 2016.

FASINA, F. O. et al. The cost-benefit of biosecurity measures on infectious diseases in the Egyptian household poultry. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, n. 2–3, p. 178–191, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.09.016>>.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro surveillance**, v. 21, n. 17, p. 1–6, 2016.

FILIPPITZI, M. E. et al. Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–18, 2017.

FRASER, R. W. et al. Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: Two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. 109–115, 2010.

FUKUDA, A. et al. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 163–164, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.010>>.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006-09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070–2074, 2011.

GELAUE, P. et al. Biocheck.UGent: A quantitative tool to measure biosecurity at broiler farms and the relationship with technical performances and antimicrobial use. **Poultry Science**, v. 93, p. 2740–2751, 2014.

GIBBENS, J. C. et al. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, p. 85–99, 2001.

GRAHAM, M. Frequency and duration of handwashing in an intensive unit. **American Journal of Infection Control**, v. 18, p. 77–81, 1990.

GUNN, J. S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 284–290, 2008.

GWYOTHER, C. L. et al. The environmental and biosecurity characteristics of livestock carcass disposal methods: A review. **Waste Management**, v. 31, n. 4, p. 767–778,

2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2010.12.005>>.

HALD, B.; WEDDERKOPP, A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p. 123–131, 2000.

HAZELEGER, W. C. et al. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B Variant Java between successive broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 6887–6891, 2008.

HE, L. Y. et al. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: Identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 13120–13129, 2014.

HERNÁNDEZ, M. et al. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, p. 1–5, 2017.

JOSHI, P. R. et al. Molecular Characterization of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chickens: First Report from Nepal. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 846–854, 2019.

KA-ODUD, H. A.; ZAKIA, M. A.; KAMEL, M. M. Evaluation of the immune response in AI vaccinated broiler chickens: Effect of biosecurity faults on immune response. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 4, p. 390–396, 2008.

KALBASI, A. et al. Carcass Composting for Management of Farm Mortalities: A Review. **Compost Science & Utilization**, v. 13, p. 180–193, 2005.

KATSUNUMA, Y. et al. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococci* in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 273–279, 2007.

KEMPF, I. et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 379–383, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012>>.

KOUTSOUMANIS, K. et al. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. **EFSA Journal**, v. 17, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5596>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

KUHNERT, P. et al. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 1, p. 1–7, 2012.

LAANEN, M. et al. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 2, p. 508–512, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.029>>.

LAANEN, M. et al. Pig, cattle and poultry farmers with a known interest in research have comparable perspectives on disease prevention and on-farm biosecurity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 115, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.015>>.

LAGATTA, L.; GAMEIRO, A. H. Costs of biosecurity measures in Brazilian laying hens farms in response to policies against Avian Influenza, Newcastle Disease and *Salmonellosis*. **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 18, n. 2, p. 231–238, 2017.

LANDMAN, D. et al. Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 449–465, 2008.

LE BOUQUIN, S. et al. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 3–4, p. 245–251, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.09.014>>.

LI, M. et al. Global disease burden of pathogens in animal source foods, 2010. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 2019.

LIM, S. K. et al. First detection of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from livestock between 2013 and 2015 in South Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6991–6993, 2016.

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

LNR - Laboratorio Nacional de Referencia, Método de Elución de Discos de Colistín. Adaptado de **Universidad de California en Los Angeles (UCLA)**, 2017. Disponível em: <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version2-Agosto2017.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

LU, Y. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *salmonella* isolates from chicken in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, 2011.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>.

MANUJA, B. K.; MANUJA, A.; SINGH, R. K. Globalization and Livestock Biosecurity.

Agricultural Research, v. 3, n. 1, p. 22–31, 2014.

MARTINS-SORENSEN, N. et al. A novel plasmid encoded *mcr-4.3* gene in a colistin resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2019.

MEAD, C.G.; IMPEY, C.S. The present status of the Nurmi concept for reducing carriage of food-poisoning salmonellae and other pathogens in live poultry. In: F.J.M., Smulders. **Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry**. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 1987. Páginas 57-77.

MENDES OLIVEIRA, V. R.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 31, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>>.

MILLMAN, C. et al. “ Catch 22 ”: Biosecurity awareness , interpretation and practice amongst poultry catchers. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 141, p. 22–32, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.002>>.

NABC, National Agriculture Biosecurity Center. USDA. **Carcass Disposal: A Comprehensive Review USDA**. 2004. Disponível em: <<https://amarillo.tamu.edu/files/2011/01/draftreport.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

NAIR, D. V. T.; VENKITANARAYANAN, K.; JOHNY, A. K. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, v. 7, n. 167, 2018.

NAMATA, H. et al. Identification of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 90, p. 211–222, 2009.

NESPECA, R.; VAILLANCOURT, J. P.; MORGAN MORROW, W. E. Validation of a poultry biosecurity survey. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, p. 73–86, 1997.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4343–4351, 2003.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, 1973.

O'NEILL, J. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final Report and Recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.

OLAITAN, A. O. et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria

and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: An epidemiological and molecular study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 6, p. 500–507, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020>>.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: A new worry and cause for vigilance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 1–3, 2016.

PERRON, G. G.; QUESSY, S.; BELL, G. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

POIREL, L. et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75–80, 2015.

POSTMA, M. et al. Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 4, p. 457–466, 2015.

POSTMA, M. et al. Evaluation of the relationship between the biosecurity status, production parameters, herd characteristics and antimicrobial usage in farrow-to-finish pig production in four EU countries. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://www.porcinehealthmanagement.com/content/2/1/9>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

RACICOT, M. et al. Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec , Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, p. 193–199, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.011>>.

RACICOT, M. et al. Evaluation of strategies to enhance biosecurity compliance on poultry farms in Québec : Effect of audits and cameras. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, p. 208–218, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.08.004>>.

RACICOT, M. et al. Evaluation of the relationship between personality traits , experience , education and biosecurity compliance on poultry farms in Québec , Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, p. 201–207, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.08.011>>.

RAPOPORT, M. et al. First Description of *mcr-1*-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused Escherichia coli in Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4412–4413, 2016.

RIBBENS, S. et al. A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, p. 228–241, 2008.

ROBINSON, T. P. et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 110, p. 377–380, 2016.

ROER, L. et al. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014.

Eurosurveillance, v. 22, n. 31, p. 1–5, 2017.

ROSE, N. et al. Risk factors for *Salmonella* enterica subsp. enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 39, p. 265–277, 1999.

ROSE, N. et al. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, p. 9–20, 2000.

SANDER, P. et al. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1204–1211, 2002.

SCOTT, H. M. et al. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1441, p. 8–16, 2019.

SEGABINAZI, S. D. et al. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 51–55, 2005.

SEIXAS, M. A. China: Tensões Comerciais, Peste Suína Africana e Déficits no setor de grãos - Perspectivas para o setor do agronegócio: 2019 a 2023. **Embrapa**, p. 1–22, 2019.

SESTI, L.A.C. Biosseguridade em avicultura: controle integrado de doenças em avicultura. VI Simpósio Goiano de Avicultura, **Anais**, 14-16 de Abril de 2004, Goiânia, Goiás, 2004, páginas 63-86.

SESTI, L.A.C. Biosseguridade em granjas de reprodutores. In: MACARI, M.; MENDES, A. **Manejo de Matrizes de Corte**. FACTA - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas; 2ª Edição, Campinas, São Paulo, 2005.

SHEN, Z. et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 293, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X)>.

SIEKKINEN, K. M. et al. Measuring the costs of biosecurity on poultry farms: A case study in broiler production in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 12, p. 1–8, 2012.

SIEWERDT, F. **Biossegurança na produção comercial de frangos**. In: Aves e Ovos. Universidade Federal de Pelotas, v.13, 2005.

SKOV, M.N. et al. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* spp and Thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. **Avian Diseases**, v.48, p.9-18, 2004.

SMITH, S. et al. The impact of biosecurity and partial depopulation on *Campylobacter* prevalence in Irish broiler flocks with differing levels of hygiene and economic performance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 6, 2016.

SYLEJMANI, D. et al. Associations Between the Level of Biosecurity and Occurrence of *Dermanyssus gallinae* and *Salmonella* spp. in Layer Farms . **Avian Diseases**, v. 60, n. 2, p. 454–459, 2016.

TABLANTE, N. L. et al. A Survey of Biossecurity Practices as Risk Factors Affecting Broiler Performance on the Delmarva Peninsula. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 730–734, 2002.

VAILLANCOURT, J.-P. Can we talk? **Canadian Poultry Magazine**, 2009. Disponível em: < <https://www.canadianpoultrymag.com/can-we-talk-1748/>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VAN DE GIESSEN, A. W. et al. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. **Epidemiol. Infec.**, v. 117, p. 245–250, 1996.

VAN STEENWINKEL, S. et al. Assessing biosecurity practices , movements and densities of poultry sites across Belgium , resulting in different farm risk-groups for infectious disease introduction and spread. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 259–270, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.12.004>>.

VIEIRA, A. R. et al. Human Contacts and Potential Pathways of Disease Introduction on Georgia Poultry Farms. **Avian Diseases**, v. 53, n. 1, p. 55–62, 2009.

VILA, J. et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, p. 437–463, 2016.

VOUNBA, P. et al. Prevalence of colistin resistance and *mcr-1/mcr-2* genes in extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from chickens in Canada, Senegal and Vietnam. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, p. 222–227, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.002>>.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>>.

WILKINSON, K. G. The biosecurity of on-farm mortality composting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 609–618, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. 5th. Rev, 2017.

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin- resistance gene, *mcr-2* , in *Escherichia coli*, Belgium , June. **Eurosurveillance**, v. 21, 2016.

XIONG, W. et al. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. **Microbiome**, v. 6, n. 34, p. 1–11, 2018.

YADAV, S.; JHA, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2019.

YAHAV, D. et al. Colistin: New lessons on an old antibiotic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 18–29, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03734.x>>.

YASSIN, A. K. et al. Identification and characterization of *mcr* mediated colistin resistance in extraintestinal *Escherichia coli* from poultry and livestock in China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, 2017.

YIN, W. et al. Novel plasmid mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **American Society for Microbiology**, v. 8, n. 3, 2017.

ZHANG, J. et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. **Scientific Reports**, v. 8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22084-4>>.

ZHANG, X. F. et al. Possible transmission of *mcr-1*–harboring *Escherichia coli* between companion animals and human. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1679–1681, 2016.

ZHI, C. et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 292–293, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00063-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00063-3)>.

Quadro 3 - Formulário de Biosseguridade

I. Formulário utilizado na coleta de dados sobre programa de biosseguridade						
Empresa:						
Cidade/Estado:						
Entrevistador:						
Data da entrevista:						
Produtor/Integrado:						
Nº de galpões:						
Alojado ou Vazio:						
Nº aves abatidas/dia:						
Parte I. Análise da área externa da granja						
A. Proteção da granja						
Numero	Tipo	Questão	Resposta (0, 5, 10)	Peso da questão	Total	Explicação
1	Q	Fornecimento das aves apenas de origem controlada		3	0	10 - Matriz própria ou fornecedor a longo tempo e presença de certificado sanitário 5 - Compra de diferentes fornecedores ou fornecedor a curto-tempo e presença de certificado sanitário 0 - Compra de diferentes fornecedores ou fornecedores a curto-tempo e ausência de certificado sanitário
2	Q,E	Distância de fontes de infecção (outras granjas, frigoríficos, aterros sanitários, fábrica de ração)		3	0	10 - >1000m 5 - 500 - 1000m 0 - <500m
3	Q,E	Aves silvestres nas proximidades da granja		3	0	10 - Não notável 5 - Notável (algumas aves) 0 - Muito notável (muitas aves)
4	Q,E	Outra criação (animais de produção) na granja, na propriedade ou nas propriedades ao redor		2	0	10 - Nenhum 5 - Gado, carneiro 0 - Galinhas, suínos
5	E	Presença de "cinturão verde" como barreira sanitária		1	0	10 - Sim 0 - Não
6	Q,E	Livro de Visitas na granja		1	0	10 - Devidamente completado (procedência, ultimo contato com animais) 5 - Não completado adequadamente 0 - Não há livros de visitas
7	Q,E	Política de Vazio Sanitário para visitantes		1	0	10 - Possui política e é obedecida 5 - Possui política mas não é obedecida 0 - Não possui política
8	Q,E	Presença de arco de desinfecção para veículos (funcionamento, presença de desinfetante, uso)		3	0	10 - Sim, funcionando adequadamente e uso regular 5 - Sim, necessita de ajustes 0 - Ausência, sem funcionalidade, sem uso de desinfetante
9	Q,E	Registro da desinfecção do veículo que transporta os animais (incubatório, abatedouro, caminhão de ração)		1	0	10 - Sim, e ação corretiva implementada se necessária 5 - Sim, mas sem controle 0 - Não
10	E	Presença de cercas na granja		2	0	10 - Cerca íntegra e em torno de toda a granja 5 - Cerca Parcial ou com aberturas 0 - Sem cerca
11	Q,E	Conformidade sanitária da equipe de trabalho contratada (serviços: equipe de carregamento, vacinação, veterinários)		2	0	10 - De acordo com os requerimentos sanitários - desinfecção das mãos e troca de sapatos ao entrar nos galpões 5 - Parcialmente de acordo, necessita de ajustes 0 - Sem uso de calçados diferentes (ou propés) para entrar no galpão, sem lavar as mãos/álcool
12	Q	Treinamento dos funcionários em relação a biosseguridade		2	0	10 - Implementado no calendário de treinamentos e feito regularmente 5 - Feito de forma pontual, esporadicamente 0 - Nunca foi feito
B. Área suja						
13	Q,E	Distância entre os galpões da granja		3	0	10 - >20m 5 - 10-20m 0 - <10m
14	E	Manutenção da área ao redor dos galpões (entulhos, água parada, vegetação intensa)		2	0	10 - área limpa (sem entulhos, água parada) 5 - área necessita de algumas adequações 0 - área muito desorganizada, esconderijo para roedores
15	E	Caminhos na granja (próximo aos galpões) pavimentados		2	0	10 - Sim, facilitando a desinfecção 0 - Não, não é possível a limpeza e desinfecção
16	E	Destino das carcaças - qualidade da compostagem: presença de odor forte, presença de chorume, partes das aves a mostra, presença de cobertura		3	0	10 - Boa qualidade da compostagem: todos os critérios obedecidos 5 - Qualidade regular da compostagem: 1 critério não obedecido 0 - Baixa qualidade da compostagem: > 1 critério não é obedecido
17	E	Destino das carcaças - distância da composteira ao galpão		2	0	10 - Distante (> 50 m) 0 - Próxima (< 50 m)
18	Q,E	Destino das carcaças - fluxo da equipe de trabalho		2	0	10 - Fluxo unidirecional (compostagem é a última atividade do dia) 0 - Fluxo unidirecional não obedecido, equipe volta ao galpão após ir na composteira
19	Q	Compra de cama com controle de qualidade		3	0	10 - Sim 0 - Não
20	E	Arrumação do silo/ambiente de armazenamento do alimento		2	0	10 - Arrumado, sem derramamento 5 - Pouco desarrumado e com algum derramamento 0 - Sujo, muito derramamento
21	Q,E	Limpeza e Desinfecção dentro do silo		2	0	10 - Feita depois de cada lote 5 - Sim, frequência inconsistente 0 - Nunca

C. Separação entre área limpa e suja						
22	Q,E	"Barreira higiênica": disponibilidade de pia, arrumação		2	0	10 - Limpo e arrumado, recursos (ex: detergente) disponíveis 5 - Desarrumado, recursos parcialmente disponíveis (ex: ausência de sabonete/detergente) 0 - Não possui, sujo/desarrumado, falta de muitos recursos
23	Q,E	Limpeza das mãos (pelos granjeiros)		2	0	10 - Uso frequente e consistente (com sabão) 5 - Uso frequente, mas necessita de adequações 0 - Uso esporádico e inconsistente
24	Q,E	Sapatos dedicados ou desinfecção por galpão		3	0	10 - Mudança de sapatos/uso de diferente propés em cada galpão 0 - Não disponível/Sem procedimento
25	Q,E	Presença de cal na entrada do galpão		3	0	10 - Com cal e em condições adequadas 0 - Sem cal ou em condições inadequadas (ex: empedrado)
26	Q,E	Galpões possuem locais específicos para o armazenamento de animais mortos antes da compostagem/recipiente é fechado		3	0	10 - Possui local específico e adequado (os animais mortos são devidamente isolados) 0 - Não possui local específico ou adequado, aves acumuladas na área interna do galpão ou de livre acesso na área externa
27	Q,E	Proteção do galpão contra roedores na área externa: Porta iscas fora do galpão		3	0	10 - Disponíveis, limpos, com iscas, em intervalos de 25-30m 5 - Sem iscas em alguns porta-iscas, intervalos maiores 0 - Não disponíveis ou sem iscas
28	Q,E	Monitoria e controle de roedores na área externa		3	0	10 - Regularmente (1x a cada 15 dias) e sem roedores 5 - Esporadicamente (<1x quinzenal) e/ou presença de roedores ocasionalmente 0 - Sem controle e/ou presença de roedores frequente
29	Q,E	Documentação das medidas de controle de pragas		1	0	10 - Documentação completa no local 5 - Documentação parcialmente disponível 0 - Sem plano ou sem relatos
30	Q, E	Gatos e cachorros na granja		3	0	10 - Ausência destes animais, não entram nas delimitações da granja 5 - Transitam nas instalações da granja 0 - Possuem acesso aos galpões
31	Q,E	Análise microbiológica da ração		1	0	10 - mín 1x/ano, resultados conformes 0 - não realizam anualmente, resultados não conformes
32	Q,E	Análise microbiológica da linha de água de bebida		1	0	10 - mín 1x/ano, resultados conformes 0 - não realizam anualmente, resultados não conformes
33	Q,E	Ferramentas (ex: pás) específicas do galpão / Limpeza e desinfecção do maquinário antes de usar em diferentes galpões		3	0	10 - Ferramentas específicas por galpão ou todos equipamentos e maquinários são sempre desinfetados antes de entrar no galpão 5 - Equipamentos não exclusivos ou limpos e desinfetados somente esporadicamente 0 - Equipamentos não exclusivos e nunca limpos
Parte II. Análise interna do galpão						
A. Manejo						
34	Q,E	Checamagem da condição sanitária/coleta de aves doentes e mortas		3	0	10 - 2 x ao dia 5 - 1 x ao dia 0 - Não diariamente
B. Limpeza e Desinfecção/Controle de pragas						
35	Q,E	Tratamento (fermentação, uso de cal) da cama após saída do lote		3	0	10 - Sim 0 - Não
36	Q,E	Implementação de um plano estruturado de limpeza e desinfecção após a saída do lote		3	0	10 - Feito depois de cada ciclo, sem deficiências 5 - Não é feito depois de cada ciclo ou com pequenos desvios (limpeza inadequada das superfícies) 0 - Não é feito depois de cada ciclo ou com desvios notáveis (uso incorreto - tempo/concentração do desinfetante)
37	Q	Período de Intervalo entre os lotes (desde a saída até a chegada do próximo lote)		3	0	10 - >=14 dias 5 - 8 - 13 dias 0 - <= 7 dias
38	Q	Obedece tempo de Vazio Sanitário (período que compreende depois da limpeza e desinfecção)		3	0	10 - Sim 0 - Não
39	Q,E	Desinfecção de comedouros e bebedouros após a saída do lote		3	0	10 - Depois de cada ciclo e com controle microbiológico da limpeza e desinfecção 5 - Depois de cada ciclo, mas sem controle microbiológico da limpeza e desinfecção 0 - Não feito a cada saída do lote
40	Q,E	Controle de roedores dentro do galpão		3	0	10 - Ausência de roedores 5 - Já visto, mas muito esporádico 0 - Ausência de roedores
41	Q,E	Monitoria e controle de insetos (ex: cascudinhos) dentro do galpão		3	0	10 - Regularmente (1x semana) e baixa infestação 5 - Esporadicamente (<1x semana) e/ou média infestação 0 - Sem controle e/ou alta infestação
C. Qualidade da Mão de Obra						
42	Q	Como você (veterinário) classificaria a qualidade da mão de obra dessa granja: preocupação da equipe de trabalho com manejo, ambiência, limpeza?		3	0	10 - Muito boa 5 - Regular 0 - Ruim
Total:						
Nº de criadas na mesma cama:						
Observações:						

E - Estimativa
Q - Questionamento

10 - Adequado
5 - Precisa de ajustes
0 - Inadequado