











Ocorrência de genes de resistência a antibióticos em granjas avícolas localizadas no nordeste do Brasil

Antibiotic resistance gene occurrence in poultry farms in northeast Brazil

Henrique Francisco de Almeida¹ , Paulo Ricardo Conceição Marques Trindade¹ , César Roberto Viana Teixeira¹ , Claudson Oliveira Brito¹ , Silvio Santana Dolabella¹ , Sona Jain¹ , Maíra Pompeu Martins¹ , Ana Andréa Teixeira Barbosa^{*1} 

¹ Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil. 

*Autor correspondente: ana.barbosaufs@yahoo.com.br

Recebido: 07 de maio, 2024. Aceito: 11 de outubro, 2024. Publicado: 06 de fevereiro, 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

Resumo: O uso indevido de antibióticos na produção animal pode exercer pressão seletiva sobre cepas bacterianas, intensificando a disseminação de bactérias patogênicas e comensais portadoras de genes de resistência a antibióticos (GRAs). O objetivo deste estudo foi investigar a presença de GRAs em camas de frango provenientes de granjas avícolas localizadas no Estado de Sergipe, no Nordeste do Brasil. Um total de 14 amostras de cama de frango foram coletadas de doze fazendas e submetidas à extração de DNA total. A presença de GRAs foi testada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando primers para principais classes de antibióticos. GRAs foram confirmados em todas as amostras, e a maior positividade para resistência foi obtida para tetraciclina (*tetA*, *tetM*, and *tetG*), quinolonas (*gyrA* and *qnrS*), beta-lactâmicos (*blaTEM*), macrolídeos (*ermB*) e sulfonamidas (*su1-1*). O sequenciamento e a comparação com o banco de dados GenBank confirmaram a identidade dos GRAs. Algumas das sequências amplificadas por PCR eram semelhantes a fatores de resistência encontrados em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo de diferentes espécies, principalmente enterobactérias. Além disso, foi observada semelhança para determinantes de resistência localizados tanto no cromossomo quanto em plasmídeos, transposons e integrons. Nossos resultados indicam o potencial da criação de aves para a disseminação ambiental de GRAs no Estado de Sergipe.

Palavras-chave: bactérias resistentes a antibióticos; esterco de aves; disseminação ambiental; antimicrobiano; aves

Abstract: The misuse of antibiotics in food-producing animal farming practices exerts selective pressure on bacterial strains, intensifying the spread of pathogenic and commensal bacteria carrying antibiotic resistance genes (ARGs). We conducted a study aiming to investigate ARGs in chicken litter from farms in the State of Sergipe, Northeast Brazil. A total of 14 chicken litter samples were collected from twelve farms and subjected to total DNA extraction. The presence of ARGs in the obtained material was tested by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers for selected ARGs. ARGs were confirmed in all samples, and the highest resistance positivity



was obtained for tetracyclines (*tetA*, *tetM*, and *tetG*), quinolones (*gyrA* and *qnrS*), beta-lactams (*blaTEM*), macrolides (*ermB*) and sulfonamides (*sul-1*). Sequencing and comparison with the GenBank database confirmed the identity of the ARGs. Some of the sequences that were amplified by PCR were similar to resistance factors found in Gram-positive and Gram-negative bacteria of different species, mostly enterobacteria. Furthermore, similarity was observed for resistance determinants located both on the chromosome and on plasmids, transposons, and integrons. Our results indicate the potential of poultry farming for the environmental dissemination of ARGs in the State of Sergipe.

Keywords: antibiotic-resistant bacteria; poultry manure; environmental dissemination; antimicrobial; avian

1. Introdução

O uso de antibióticos na produção animal, especialmente na avicultura, tanto para fins profiláticos e terapêuticos quanto como promotores de crescimento, é apontado como uma das principais causas da disseminação da resistência ^(1,2). A resistência a antibióticos tornou-se um grave e generalizado problema de saúde pública, e as práticas do sistema agropecuário podem intensificar a disseminação de determinantes de resistência a antibióticos no meio ambiente ⁽³⁻⁵⁾. Os determinantes de resistência a antibióticos incluem os próprios antibióticos, bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência a antibióticos (GRAs). Quando essas bactérias estão no ambiente, os antibióticos podem matar BRAs e permitir que bactérias comensais adquiram GRAs por meio de mecanismos de transferência horizontal de genes (THG) ⁽⁶⁻⁸⁾. No ambiente, esses determinantes de resistência podem alcançar cepas bacterianas patogênicas de humanos e animais, representando um sério problema de saúde pública ^(9,10).

Determinantes de resistência a antibióticos são eliminados nos excrementos de aves, que são amplamente utilizados como fertilizante orgânico ⁽¹¹⁻¹³⁾, o que pode contribuir para a introdução de BRAs e GRAs no solo ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Isso resulta no acúmulo e na absorção desses micropoluentes pelas plantas, afetando assim humanos e animais por meio da cadeia alimentar ^(9,10,15).

Desde o final da década de 1990, o Brasil tem observado uma redução progressiva no uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais. ⁽¹⁷⁾. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implementou o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos, por meio de Instruções Normativas, proibindo o uso de tetraciclinas, beta-lactâmicos (benzilpenicilina e cefalosporinas), quinolonas, sulfonamidas, colistina, tilosina, lincomicina e tiamulina como promotores de crescimento, com o objetivo de conter o avanço da resistência aos antimicrobianos. ⁽²¹⁾.

Considerando o crescente consumo de antibióticos na produção animal, apesar dos esforços para reduzir seu uso, e a relevância do Brasil como produtor e exportador de carne de frango, o objetivo do presente estudo foi verificar a presença de GRAs no esterco de aves de diferentes granjas localizadas no estado de Sergipe, no Nordeste do Brasil.

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo e coleta de amostras

Um total de 14 amostras foram coletadas, sendo dez (10) provenientes de cama de frango (frangos de corte) e quatro (4) de esterco de poedeiras (designadas como G1 a G14 na Tabela 1). Essas amostras foram coletadas em doze granjas situadas em sete municípios do estado de Sergipe, Brasil, no período de setembro de 2021 a fevereiro de 2022. Especificamente, os pontos de amostragem foram distribuídos da seguinte forma: Estância (n=5), Areia Branca (n=4), Umbaúba (n=1), Nossa Senhora da Glória (n=1), Carira (n=1), Frei Paulo (n=1), e Campo do Brito (n=1). A Figura 1 exibe as localizações dos municípios incluídos no estudo.

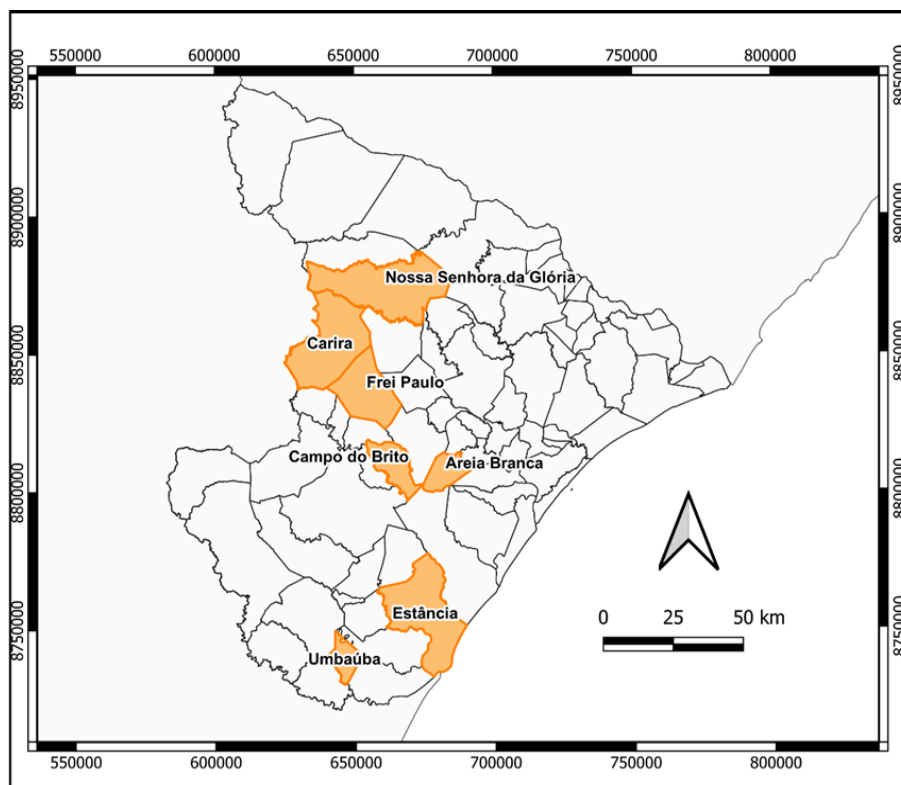


Figura 1. O estado de Sergipe, Brasil, e as localizações dos municípios na área do estudo (destacadas em amarelo).

As amostras de G11 a G14 foram coletadas na mesma granja, representando distintas fases de desenvolvimento das aves: G11 durante as primeiras dez semanas de vida das aves; G12 durante a fase de recria, que vai da 10^a à 17^a semana de desenvolvimento; e G13 e G14 no início e no final, respectivamente, da fase de postura, cobrindo da 18^a à 72^a semana do ciclo de crescimento das aves. ⁽²²⁾. Para criar uma amostra composta, foram coletados um mínimo de 20 subamostras utilizando o método zigue-zague e, em seguida, homogêneas para produzir uma fração de aproximadamente 300 g (amostra total). Essas amostras foram colocadas em sacos plásticos, devidamente rotuladas para identificação, e transportadas para o Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram armazenadas a -20°C até o processamento e posterior análise. Informações detalhadas sobre as amostras coletadas neste estudo estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das amostras com seus respectivos municípios, tipo de produção avícola e promotor de crescimento utilizado.

Amostra	Município	Localização Geográfica	Tipo de produção	Duração do ciclo de criação	Promotor de crescimento
G1	Estância	S 12°49'55" W 38°32'33"	corde	110	Enramicina 8%
G2	Estância	S 12°47'27" W 38°40'55"	corde	130	Enramicina 8%
G3	Estância	S 12°47'2" W 38°37'45"	corde	165	Enramicina 8%
G4	Estância	S 12°47'15" W 38°40'55"	corde	210	Enramicina 8%
G5	Umbaúba	S 12°38'49" W 38°20'9"	corde	240	Enramicina 8%
G6	Estância	S 12°46'54" W 38°38'16"	corde	260	Enramicina 8%
G7	Nossa Senhora da Glória	S 11°41'59" W 38°34'42"	corde	42	Não informado
G8	Carira	S 11°34'7" W 38°10'43"	corde	45	Halquinol + Monensina 3
G9	Campo do Brito	S 11°12'38" W 38°20'29"	corde	52	Salinomocina 4
G10	Frei Paulo	S 11°28'9" W 38°29'53"	corde	120	Halquinol + Salinomocina
G11 ¹	Areia Branca	S 11°14'6" W 38°40'50"	poedeira	21	Halquinol + Salinomocina
G12 ¹	Areia Branca	S 11°14'6" W 38°40'50"	poedeira	70	Halquinol + Salinomocina
G13 ²	Areia Branca	S 11°13'39" W 38°37'48"	poedeira	140	Bacitracina de zinco
G14 ²	Areia Branca	S 11°13'39" W 38°37'48"	poedeira	546	Bacitracina de zinco

¹G11 e G12; ²G13 e G14: mesma granja, mas diferentes aviários. ^{3,4}Monensina e Salinomocina: utilizadas contra a coccidiose avícola

2.2. Processamento das amostras e extração do DNA

O processamento das amostras foi adaptado seguindo a metodologia descrita por Subirats et al. ⁽²³⁾. Da amostra total de cama de frango, 20 g foram diluídos em 200 mL de solução salina (0,85% NaCl), e as suspensões foram agitadas manualmente por aproximadamente cinco minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas, distribuídas em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas (5000 rpm por 12 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado duas vezes com uma solução salina (5000 rpm por 12 minutos a 4°C). O pellet foi ressuscitado em solução salina e armazenado a -20°C até a extração de DNA. Para a extração de DNA, foi utilizado o QIAamp Fast DNA Stool Kit (QIAGEN, Valencia, CA, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do material genético extraído foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Epoch, Microplate Spectrophotometer, Biotek, Agilent®).

2.3. Detecção de genes de resistência a antibióticos

O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* para 16S rRNA e para os principais genes de resistência relacionados à antibióticos utilizados na avicultura (Tabela 2). As condições para a PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 55°C a 60°C (30 segundos) e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os controles positivos para os genes *tetA*, *tetB* e *mcr-1* foram isolados de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*⁽⁵⁶⁾ e fornecidos pelo Laboratório de Genética Molecular de Bactérias da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Para os outros genes avaliados, os controles positivos foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Sergipe⁽²⁴⁾.

2.4. Sequenciamento

As bandas amplificadas por PCR foram purificadas utilizando o Kit de Purification Promega, quantificadas com um espectrofotômetro (Epoch, Microplate Spectrophotometer, Biotek, Agilent®) e sequenciadas na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. As sequências obtidas foram comparadas utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do GenBank, NCBI – National Center for Biotechnology Information. As amostras para sequenciamento foram selecionadas levando em consideração o melhor desempenho de amplificação de um único gene de cada granja.

Tabela 2. *Primers* utilizados para a detecção de 16S rRNA e genes de resistência a antibióticos em amostras de cama de frango.

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (° C)	Comprimento da amplificação(bp)	Ref
16S rRNA	FW	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1500	25
	RV	GGTTACCTGTTACGACTT			
<i>tetA</i>	FW	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	58	210	26
	RV	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetB</i>	FW	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG	55	659	26
	RV	GTAATGGGCCAATAACACCG			
<i>tetG</i>	FW	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	58	468	26
	RV	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
<i>tetM</i>	FW	TTTATCTGTATCACCGCTTCCG	60	154	27
	RV	ACAATCCGTCACATCCAACC			
<i>gyrA</i>	FW	AGCGACCTTGCAGAGAAAT	60	330	27
	RV	GGAACCGAAGTTACCTGACC			
<i>qnrS</i>	FW	TTGCCATCAAGTGAGTAATCG	60	341	27
	RV	AGGATAAACAACAATACCCAGTGC			
<i>blaTEM</i>	FW	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	60	800	28
	RV	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
<i>ermB</i>	FW	TAACGACGAACTGGCTAAAATAAG	60	419	27
	RV	AACATCTGTGGTATGGCGGG			
<i>sul-1</i>	FW	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	56	163	27
	RV	TGAAGTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>mcr-1</i>	FW	CGGTCAGTCCGTTGTTC	55	309	29
	RV	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			

3. Resultados

3.1 Detecção de genes de resistência a antibióticos

Todas as amostras testadas apresentaram resultados positivos para pelo menos um dos GRAs investigados. Cinco dos genes testados—*tetM*, *gyrA*, *bla*TEM, *ermB* e *sul-1*—foram positivos em todas as amostras analisadas (Tabela 3). Os genes *qnrS* e *mcr-1* não foram detectados nas amostras G13 e G14, respectivamente. Todos os genes de resistência a tetraciclinas foram detectados nas amostras: G1 (Estância), G3 (Estância), G5 (Umbaúba), G7 (Nossa Senhora da Glória) e G9 (Campo do Brito), destacando a disseminação dos genes de resistência a antibióticos nas granjas avícolas. As amostras G1, G3 e G5 apresentaram resultados positivos para todos os *primers* testados (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de detecção de genes de resistência a antibióticos em amostras de granjas avícolas (G1 a G14) coletadas de setembro de 2021 a fevereiro de 2022, no estado de Sergipe, Brasil.

Classe de antibiótico	Gene	Amostras														Total	%
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14		
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	11	78,6
	<i>tetB</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	9	64,3
	<i>tetG</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	11	78,6
	<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
Quinolonas	<i>gyrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
	<i>qnrS</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	12	85,7
Beta-lactâmicos	<i>bla</i> -TEM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
Macrolídeos	<i>ermB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
Sulfonamidas	<i>sul-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	100
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	10	71,4
	Total	10	7	10	9	10	6	9	6	9	9	10	10	9	10	123	87,86

3.2 Sequenciamento

O sequenciamento e a comparação com o banco de dados do GenBank confirmaram a identidade dos genes (Tabela 4). Os resultados mostraram similaridade com determinantes de resistência presentes em bactérias de diferentes espécies, demonstrando seu caráter ubíquo. Os resultados foram semelhantes tanto para cepas Gram-positivo quanto para Gram-negativo, sendo as enterobactérias as mais semelhantes. Isso era esperado, já que as amostras provinham dos sistemas digestivos das aves ^(2, 7, 12) (Tabela 4).

Para o gene *tetA*, a sequência analisada apresentou 100% de identidade com genes presentes no genoma de cepas de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, e *Klebsiella pneumoniae*. Uma identidade de 100% também foi observada com *Acinetobacter*

baumannii para *tetB*, enquanto para outras linhagens, como *Vibrio cholerae*, apresentou uma identidade de 99,85% (Tabela 4). Entre os genes de tetraciclina, *tetG* apresentou menor identidade com as cepas de referência: a maior identidade registrada foi de 92,27% com um clone bacteriano não cultivado. Outras linhagens como *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram menor porcentagem de identidade (90.34%). Para o gene *tetM*, todas as linhagens analisadas apresentaram identidade de 95.79%, incluindo para *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis* (Tabela 4).

Uma identidade de 100% para o gene *gyrA* foi observado para linhagens de *E. coli* e *Salmonella* sp., enquanto *S. flexneri* e *Shigella dysenteriae* mostraram identidade de 99.35% e 99.68%, respectivamente. Várias linhagens de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apresentaram identidade de 100% para o gene *qnrS* (Tabela 4). Para o gene *bla*TEM, a identidade de 99.71% foi observada para muitas linhagens, incluindo *E. coli* e *A. baumannii*. O gene *ermB* apresentou 99.05% de identidade com genes presentes no genoma de *Streptococcus suis*, *Clostridium perfringens*, e *E. faecalis*. A sequência do gene *sul1* exibiu 100% de identidade com determinantes genéticos de *Enterobacter cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Para o gene *mcr-1*, 100% de identidade foi encontrada para genes localizados no genoma de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium e *Raoultella ornithinolytica* (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado da análise de sequenciamento de genes de resistência a antibióticos amplificados a partir de amostras de cama de frango, utilizando o banco de dados GenBank.

Gene	Linhagem de referência: espécie e fonte	Identidade (%)	Nº de acesso no GenBank	Região alinhada	Localização do gene
<i>tetA</i>	<i>Escherichia coli</i> PBM64, gene de bomba de efluxo de tetraciclina <i>tetA</i> , parcial cds	100	OQ625508.1	2 a 210	1..210
	<i>Shigella flexneri</i> cepa 2ª Sflex 21-42, plasmídeo não nomeado 4, sequência completa	100	CP121221.1	21440 a 21648	21318..22517
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Uganda</i> RM018, plasmídeo <i>pRM018_1</i> , sequência completa.	100	CP117383.1	26328 a 26536	26206..27405
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IM007 plasmídeo <i>pIM007_ESBL</i> , sequência completa.	100	CP095430.1	8091 a 8299	7222..8421
<i>tetB</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> S402, <i>tetB</i> gene, parcial cds.	100	MK506781.1	1 a 656	1..656
	<i>Vibrio cholerae</i> BY369, plasmídeo <i>pBY369-1</i> , sequência completa.	99,85	CP090380.1	35342 a 35999	35190..36395
	<i>Avibacterium paragallinarum</i> AG21-0333, cromossomo, genoma completo	99,85	CP104914.1	81099 a 81756	80703..81908
	<i>Escherichia coli</i> CMCY6, gene de bomba de efluxo para tetraciclina MFS, <i>tet(B)</i> , cds completo.	99,85	OM977025.1	397 a 1054	1..1206

	Clone de bactéria não-cultivável G0-1, proteína de resistência a tetraciclina classe G (<i>tetG</i>), parcial cds.	92,27	KJ603177.1	2 a 415	1..468
<i>tetG</i>	<i>Proteus mirabilis</i> HN2p, cromossomo, sequência completa.	90,34	CP046048.1	5799 a 6212	5346..6521
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AR_0111, cromossomo, sequência completa.	90,34	CP032257.1	2703701 a 2704114	2703248..2704423
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 309074, plasmídeo p309074-1, sequência completa.	90,34	CP030297.1	99949 a 100362	99496..100671
<i>tetM</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> PHEGBS0463, transposon Tn7539, sequência completa.	95,79	OP715847.1	19907 a 20001	18569..20488
	<i>Enterococcus faecalis</i> W5, plasmídeo pW5-2, sequência completa.	95,79	CP118757.1	8140 a 8234	7653..9572
	<i>Gallibacterium anatis</i> IMT49310, cromossomo, sequência completa.	95,79	CP110225.1	1611696 a 1611790	1611209..1613128
	<i>Staphylococcus aureus</i> , N09CSA16, cromossomo genoma completo.	95,79	CP091525.1	1671366 a 1671460	1670028..1671947
<i>gyrA</i>	<i>Escherichia coli</i> 128, gene da DNA girase A (<i>gyrA</i>), parcial cds.	100	KC493126.1	1 a 328	1..626
	<i>Salmonella</i> sp. S13, cromossomo, sequência completa	100	CP047094.1	2928257 a 2928585	2925962..2928589
	<i>Shigella flexneri</i> B36, subunidade A do gene da DNA girase (<i>gyrA</i>), parcial cds.	99,35	KU586842.1	1 a 309	1..645
	<i>Shigella dysenteriae</i> strain NK3898, DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds.	99,68	KU586846.1	1 a 309	1..645
<i>qnrS</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KSH203, plasmídeo pKSH203- <i>qnrS</i> , sequência completa.	100	CP034326.1	146224 a 146562	146216..146872
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , plasmídeo pP6qnrS1, sequência completa	100	MH061383.1	68516 a 68854	68206..68862
	<i>Enterobacter cloacae</i> 3849, plasmídeo p3846_IncN_VIM-1, sequência completa.	100	CP052872.1	16839 a 17177	16529..17185
	<i>Escherichia coli</i> MN067 gene <i>qnrS</i> para proteína de repetição pentapeptídica de resistência a quinolona <i>qnrS12</i> , complete CDS	100	NG_059276.1	411 a 749	101..757
<i>blaTEM</i>	<i>Escherichia coli</i> BLG15, gene de beta-lactamase de classe A de espectro amplo TEM-1(<i>blaTEM</i>), <i>blaTEM</i> -1 alelo, completo cds.	99,71	OQ625507.1	80 a 763	1..861
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPN6328, plasmídeo pK6328_1, sequência completa.	99,71	CP124838.1	98097 a 98780	98018..98878
	<i>Acinetobacter baumannii</i> Aba_C-34HGM2020 HAS gene de beta-lactamase da família de classe A (<i>blaTEM</i>), cds parcial.	99,71	OP745943.1	28 a 711	1..754
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Emad-H6 gene de beta-lactamase da família TEM (<i>blaTEM</i>), cds parcial.	99,71	OQ784849.1	80 a 763	1..857
<i>ermB</i>	<i>Streptococcus suis</i> STC78 ICensui78-tetO- <i>ermB</i> elemento móvel, sequência completa.	99,05	ON944185.1	26620 a 27038	1..55758
	<i>Clostridium perfringens</i> QHY-2, plasmídeo pQHY-2, sequência completa.	99,05	CP118266.1	20960 a 21378	20833..21570
	<i>Enterococcus faecalis</i> W5, plasmídeo pW5-2, sequência completa.	99,05	CP118757.1	62670 a 63088	62478..63215
	<i>Gallibacterium anatis</i> IMT49310, cromossomo, genoma completo	99,05	CP110225.1	1613935 a 1614353	1613808..1614545

	<i>Enterobacter cloacae</i> 2017-266 intl, genes blaIMP-1, aac(6)-IIc, qacEdelta1, sul-1, cds completo.	100	LC508022.1	3763 a 3924	3218..4057
sul-1	<i>Escherichia coli</i> gene da dihidropteroato sintase (sul-1), cds parcial.	100	MN527466.1	502 a 663	1..775
	<i>Proteus mirabilis</i> HN2p, cromossomo, sequência complete	100	CP046048.1	143413 a 143574	143280..144118
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> THC-2, gene da proteína de resistência a sulfonamidas sul-1, cds parcial.	100	MK620997.1	216 a 377	1..388
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NH54, gene da fosfoetanolamina-transferase de lipídio A (mcr-1), cds completa.	100	MF149969.1	143 a 451	110..1735
mcr-1	<i>Escherichia coli</i> HKSH_MCR_161114268_EC, gene da fosfoetanolamina-transferase de lipídio A (mcr-1), alelo mcr1.9, cds completa.	100	KY685071.1	34 a 342	1..1626
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium P22, gene da fosfoetanolamina transferase (mcr-1), cds parcial.	100	MH654791.1	69 a 377	36..693
	<i>Raoultella ornithinolytica</i> TS48CTX, plasmideo pHNTS48-1, sequência completa.	100	MF135534.1	178989 a 179297	177705..179330

4. Discussão

O uso de antibióticos na produção animal leva a exposição humana a bactérias portadoras de GRAs, incluindo bactérias comensais presentes nos excrementos de aves ⁽¹²⁾. Em granjas avícolas, a ampla distribuição de bactérias resistentes e seus genes relacionados representa uma ameaça reconhecida à saúde humana e animal ^(2,3). Nossos resultados indicaram a presença dos genes *tetM*, *gyrA*, *blaTEM*, *ermB* e *sul-1* em todas as amostras analisadas (Tabela 3). Esses GRAs conferem resistência a tetraciclinas, quinolonas, beta-lactâmicos, macrolídeos e sulfonamidas, sendo os mais frequentemente detectados em amostras provenientes da avicultura ^(30,31). Em relação aos genes que conferem resistência a tetraciclinas, para onze amostras estudadas, *tetA* e *tetG* foram amplificados, enquanto nove amostras amplificaram *tetB*. Apenas duas amostras, G6 e G13 (Tabela 3), não apresentaram o gene *qnrS*, que codifica resistência a quinolonas. O gene *mcr-1*, que codifica resistência às polimixinas, foi detectado em dez amostras (Tabela 3), confirmando sua prevalência e persistência nos ambientes avícolas ⁽³²⁻³⁴⁾.

Os GRAs amplificados, após comparação com o banco de dados do GenBank, apresentaram identidade com GRAs localizados tanto no cromossomo e quanto em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons. A presença desses GRAs em elementos genéticos móveis facilita a sua dispersão entre as espécies, o que pode contribuir para a disseminação da resistência a antibióticos no ambiente ⁽³⁵⁻³⁷⁾. A maioria das cepas bacterianas selecionadas do banco de dados para análise de similaridade possuía genes associados tanto a plasmídeos quanto a cromossomos. Apenas uma cepa de *Streptococcus agalactiae* apresentou o gene *tetM* associado ao transposon 7539, e uma cepa de *Enterobacter cloacae* continha o gene *sul-1* associado a integrons de classe I (Tabela 4). O gene de resistência

a macrolídeos *ermB* foi encontrado associado ao gene *tetO* em *Streptococcus suis*. Durante eventos de transferência horizontal de genes (THG), ambos os genes podem ser transferidos simultaneamente para outra cepa bacteriana, contribuindo para a disseminação de cepas multirresistentes⁽³⁸⁾.

Esses GRAs estão relacionados a antibióticos cujo uso como promotores de crescimento é proibido pela legislação brasileira⁽¹⁷⁾. No entanto, seu uso para a prevenção e tratamento de doenças em animais é permitido sob condições específicas e supervisão adequada⁽³⁹⁾. Portanto, a presença desses GRAs na maioria das amostras pode estar associada ao uso frequente desses antibióticos para fins terapêuticos ou profiláticos^(30,31). Os dados sobre o uso de antibióticos para fins terapêuticos ou profiláticos durante o ciclo de produção avícola não estavam disponíveis nas granjas estudadas. Os promotores de crescimento utilizados nas granjas avaliadas incluem enramicina (8%), halquinol e bacitracina de zinco. A enramicina, um antibiótico polipeptídico, inibe principalmente a síntese da parede celular em bactérias Gram-positivo^(40,41). A enramicina está entre os três principais promotores de crescimento utilizados, com altas taxas de importação, aproximadamente 62,58 toneladas entre 2017 e 2019, sendo frequentemente adicionada à dieta de frangos⁽⁴²⁾. A enramicina foi utilizada pela maioria das granjas incluídas neste estudo (Tabela 1).

O halquinol é classificado como uma quinolona, mas seu mecanismo de ação difere dos representantes dessa classe. Ele afeta fungos e protozoários e é utilizado como promotor de crescimento em granjas de suínos e aves^(43,44). Neste estudo, apenas quatro estabelecimentos utilizaram esse aditivo (Tabela 1). Até o momento, nenhum caso de microrganismos resistentes ao halquinol foi relatado na literatura^(43,44). A bacitracina de zinco apresenta atividade contra bactérias Gram-positivo e serve como promotor de crescimento na avicultura. Ela é utilizada em duas granjas da área do estudo. Além disso, é empregada no tratamento de infecções por *C. perfringens* em frangos e também é utilizada topicamente em humanos^(45,46). No entanto, seu uso inadequado e disseminado tem levado ao aumento da prevalência de cepas de *C. perfringens* resistentes à bacitracina⁽⁴⁷⁾ e na detecção de GRAs em alimentos como carnes, vegetais e frutas⁽⁴⁸⁾. A detecção dos genes *tetA*, *tetB*, *bla*TEM e *sul-1* pode estar relacionada ao uso de bacitracina nas granjas estudadas. Um estudo conduzido por Diarra et al.⁽⁴⁹⁾ relacionou o uso de bacitracina à presença de linhagens multirresistentes de *E. coli* portadoras dos genes *tetA*, *tetB*, *bla*TEM e *sul-1*. O uso desse promotor de crescimento também foi associado à presença dos genes *tetA* e *sul-1* em linhagens de *E. coli* isoladas de frangos⁽⁵⁰⁾.

Monensina e salinomicina, autorizadas no Brasil para uso como promotores de crescimento em bovinos, ovinos e suínos, são empregadas para fins profiláticos na avicultura para combater a coccidiose⁽⁵¹⁾. Devido ao seu uso frequente na avicultura, casos de cepas de *Eimeria* spp. resistentes a esses antimicrobianos têm sido relatados⁽⁵¹⁾. Além disso, o uso de salinomicina como promotor de crescimento em frangos foi associado ao isolamento de *E. coli* portadora dos seguintes GRAs: *tetA*, *tetB*, *bla*TEM e *sul-1*⁽⁴⁹⁾. Todas as granjas do presente estudo que utilizaram salinomicina como promotor de crescimento testaram positivo para esses genes, exceto pela granja G9, onde o gene *tetB* não foi detectado.

Portanto, os GRAs detectados não estão diretamente relacionados aos promotores de crescimento utilizados nas granjas em estudo. Isso é preocupante, pois pode indicar uma falta de controle sobre o uso de antibióticos ou resistência cruzada aos promotores de crescimento utilizados. É importante ressaltar que, apesar das tendências globais de reduzir ou proibir o uso de antibióticos na produção animal, essas medidas não abordam efetivamente o problema da resistência bacteriana. O gene de resistência à colistina *mcr-1*, por exemplo, demonstrou conferir resistência cruzada à bacitracina. Além disso, elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, podem transportar diversos determinantes de resistência, facilitando a disseminação da resistência por meio da THG^(52,53). Assim, a detecção de GRAs neste estudo pode ser atribuída ao consumo direto de antibióticos durante o ciclo de produção avícola, bem como a outros fatores não diretamente relacionados a esses medicamentos. Além disso, não há relatos na literatura que correlacionam o uso de enramicina e halquinol com a detecção de GRAs, ressaltando a necessidade de mais pesquisas para abordar essa lacuna. Esses GRAs conferem resistência a antibióticos críticos utilizados no tratamento de doenças infecciosas em humanos⁽⁵⁴⁾.

A presença desses GRAs nos dejetos de frango representa um potencial risco para a sua disseminação no meio ambiente, especialmente considerando que o uso de cama de frango como fertilizante de solos agrícolas é uma prática comum⁽¹¹⁾. Um fator que agrava a situação é a reutilização repetida da cama de frango em múltiplos ciclos de criação, o que aumenta a diversidade e a concentração de GRAs e BRAs nos dejetos avícolas^(7,11). A maioria das granjas avícolas estudadas utilizou a cama de frango em múltiplos ciclos de produção, com apenas as amostras provenientes de G7, G8 e G9 apresentando cama fresca (Tabela 1). Os operadores das granjas confirmaram que utilizam o esterco resultante nas plantações ao redor. Essa prática promove a disseminação da resistência bacteriana ao facilitar o contato e a troca de material genético entre as bactérias entéricas presentes no esterco e as bactérias do solo^(41,55).

5. Conclusão

Considerando a presença de GRAs nas amostras analisadas e o uso da cama de frango como fertilizante em solos agrícolas, esses fatores representam um risco potencial significativo para a disseminação da resistência a antibióticos no meio ambiente. Esses determinantes de resistência podem alcançar os seres humanos por meio do contato com solo, alimentos e água contaminados, aumentando, assim, o risco de falhas no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes. Diante da relevância deste estudo, pioneiro em Sergipe, Brasil, é fundamental conscientizar os produtores sobre a utilização criteriosa de antibióticos. O tratamento adequado da cama e do esterco de frango antes da disposição no meio ambiente é crucial para mitigar esses riscos. Essa abordagem pode ajudar a avicultura a desempenhar um papel ativo na redução da disseminação da resistência bacteriana. O desenvolvimento de estratégias de manejo para mitigar a disseminação de antibióticos, BRAs e GRAs é uma prioridade para o setor de produção animal.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições dos autores

Conceituação: A.A.T.Barbosa. Análise formal: A.A.T.Barbosa. Metodologia: A.A.T. Barbosa, S. Jain, S.S. Dolabella e C.O. Brito. Supervisão: A.A.T.Barbosa. Investigação: H.F. Almeida, P.R.C.M. Trindade e C.R.V. Teixeira. Visualização: A.A.T. Barbosa, S. Jain, S.S. Dolabella, C.O. Brito, M.P. Martins. Redação (rascunho original): A.A.T.Barbosa e H.F. Almeida. Redação (revisão e edição): A.A.T.Barbosa, S. Jain, S.S. Dolabella, C.O.Brito, C.R.V. Teixeira e M.P. Martins.

Referências

1. van Cuong N, Kiet BT, Hien VB, Truong BD, Phu DH, Thwaites G, et al. Antimicrobial use through consumption of medicated feeds in chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam: A three-year study before a ban on antimicrobial growth promoters. *PLoS One*. 2021;16(4): e0250082. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0250082>
2. Langata LM, Maingi JM, Musonye HA, Kiiru J, Nyamache AK. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from chicken droppings in Nairobi, Kenya. *BMC Research Notes*. 2019;12(1):22. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4068-8>
3. Farooq M, Smoglica C, Ruffini F, Soldati L, Marsilio F, Di Francesco CE. Antibiotic resistance genes occurrence in conventional and antibiotic-free poultry farming, Italy. *Animals (Basel)*. 2022;12(18):2310. <https://doi.org/10.3390/ani12182310>
4. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence - Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*. 2020;21(12): e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
5. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. 2022;20(5):257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
6. Alalam H, Graf FE, Palm M, Abadikhah M, Zackrisson M, Boström J, et al. A high-throughput method for screening for genes controlling bacterial conjugation of antibiotic resistance. *mSystems*. 2020;5(6):e01226-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01226-20>
7. Oladeinde A, Abdo Z, Zwirzitz B, Woyda R, Lakin SM, Press MO, et al. Litter commensal bacteria can limit the horizontal gene transfer of antimicrobial resistance to *Salmonella* in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2022;88(9):e0251721. <https://doi.org/10.1128/aem.02517-21>
8. Virolle C, Goldlust K, Djermoun S, Bigot S, Lesterlin C. Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1239. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
9. Lima T, Domingues S, Silva GJ Da. Manure as a potential hotspot for antibiotic resistance dissemination by horizontal gene transfer events. *Veterinary Sciences*. 2020;7(3):110. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030110>
10. Vumazonke S, Khamanga SM, Ngqwala NP. Detection of pharmaceutical residues in surface waters of the Eastern Cape Province. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(11):4067. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114067>
11. Ngogang MP, Ernest T, Kariuki J, Mouiche MMM, Ngogang J, Wade A, et al. Microbial contamination of chicken litter manure and antimicrobial resistance threat in an urban area setting in Cameroon. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010020>
12. Wang L, Chai B. Fate of antibiotic resistance genes and changes in bacterial community with increasing breeding scale of layer manure. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:857046. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.857046>
13. Oxendine A, Walsh AA, Young T, Dixon B, Hoke A, Rogers EE, et al. Conditions necessary for the transfer of antimicrobial resistance in poultry litter. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(6):1006. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061006>

14. Chen Q, An X, Li H, Su J, Ma Y, Zhu YG. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*. 2016;92–93:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
15. Duan M, Gu J, Wang X, Li Y, Zhang R, Hu T, et al. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;180:114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.005>
16. Fatoba DO, Abia ALK, Amoako DG, Essack SY. Rethinking manure application: Increase in multidrug-resistant enterococcus spp. in agricultural soil following chicken litter application. *Microorganisms*. 2021;9(5):885. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050885>
17. Lentz SAM. Atualização sobre Uso Racional de Antimicrobianos e Boas Práticas de Produção. Opas/Mapa. 2022;1–50. Available from: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPrcticasdeProduo.pdf
18. Brasil. Instrução Normativa Nº26, de 10 de julho de 2009. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2009;9. https://wikisda.agricultura.gov.br/dipoa_baselegal/in_9-2009_listeria.pdf
19. Brasil. Instrução Normativa Nº 45, De 22 De Novembro De 2016. Dou. 2016;4. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf>
20. Brasil. Ministério da Saúde. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única. 2019;1. https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_antimicrobianos.pdf
21. Rabello RF, Bonelli RR, Penna BA, Albuquerque JP, Souza RM, Cerqueira AMF. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. *Animals (Basel)*. 2020;10(4):552. <https://doi.org/10.3390/ani10040552>
22. SENAI. Manual de Segurança e Qualidade para a Avicultura de Postura Manual de Segurança e Qualidade para a Avicultura de Postura. Embrapa. 2004;1–100. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18216/1/MANUALSEGURANCAQUALIDADEaviculturadepostura.pdf>
23. Subirats J, Murray R, Scott A, Lau CHF, Topp E. Composting of chicken litter from commercial broiler farms reduces the abundance of viable enteric bacteria, Firmicutes, and selected antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*. 2020;746:141113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141113>
24. Trindade, P. R. C. M., Dolabella, S. S., Jain, S., Nascimento, L. F. . de J., Sacramento, A. . G., Barbosa, F. H. F., & Teixeira Barbosa, A. A. (2024). Ocorrência e persistência de genes de resistência a antibióticos em estações de tratamento de esgoto em Aracaju/SE/Brasil. *Scientia Plena*, 20(10). <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2024.10620125>. Limayem A, Micciche A, Nayak B, Mohapatra S. Prokaryotic community profiling of local algae wastewaters using advanced 16S rRNA gene sequencing. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(1):704–711. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0078-z>
26. Cornejo J, Yevenes K, Avello C, Pokrant E, Maddaleno A, Martin BS, et al. Determination of chlortetracycline residues, antimicrobial activity and presence of resistance genes in droppings of experimentally treated broiler chickens. *Molecules*. 2018;23(6):1264. <https://doi.org/10.3390/molecules23061264>
27. Jia J, Guan Y, Cheng M, Chen H, He J, Wang S, et al. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. *Science of the Total Environment*. 2018;642:1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.149>
28. Furlan JPR, dos Santos LDR, Moretto JAS, Ramos MS, Gallo IFL, Alves G de AD, et al. Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. *Science of the Total Environment*. 2020;726:138100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138100>
29. Ayandiran TO, Falgenhauer L, Schmiede J, Chakraborty T, Ayeni FA. High resistance to tetracycline and ciprofloxacin in bacteria isolated from poultry farms in Ibadan, Nigeria. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2018;12(6):462–470. <https://doi.org/10.3855/jidc.9862>
30. Collignon PJ, McEwen SA. One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2019;4(1):22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>

31. Gibson JS, Wai H, Oo SSML, Hmwe EMM, Wai SS, Htun LL, et al. Antimicrobials use and resistance on integrated poultry-fish farming systems in the Ayeyarwady Delta of Myanmar. *Scientific Reports*. 2020;10(1):16149. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73076-2>
32. Anyanwu MU, Jaja IF, Okpala COR, Jaja CJI, Oguttu JW, Chah KF, et al. Potential sources and characteristic occurrence of mobile colistin resistance (mcr) gene-harbouring bacteria recovered from the poultry sector: A literature synthesis specific to high-income countries. *PeerJ*. 2021;9:e11606. <https://doi.org/10.7717/peerj.11606>
33. Wang Y, Lyu N, Liu F, Liu WJ, Bi Y, Zhang Z, et al. More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environment International*. 2021;153:106534. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106534>
34. Xu S, Lu W, Qasim MZ. High-throughput characterization of the expressed antibiotic resistance genes in sewage sludge with transcriptional analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;205:111377. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111377>
35. Yang Q, Tian T, Niu T, Wang P. Molecular characterization of antibiotic resistance in cultivable multidrug-resistant bacteria from livestock manure. *Environmental Pollution*. 2017 Oct 1;229:188–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.073>
36. Leungtongkam U, Thummeepak R, Tasanapak K, Sittthisak S. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208468>
37. Dionisio F, Zilhão R, Gama JA. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid*. 2019;102:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.01.003>
38. Karim MR, Zakaria Z, Hassan L, Mohd Faiz N, Ahmad NI. Antimicrobial resistance profiles and co-existence of multiple antimicrobial resistance genes in mcr-harbouring colistin-resistant enterobacteriaceae isolates recovered from poultry and poultry meats in Malaysia. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(6):1060. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061060>
39. OIE. World Organisation for Animal Health. List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. 2021, (Resolution No. XXVIII) Available from: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>
40. Belote BL, Tujimoto-Silva A, Hümmelgen PH, Sanches AWD, Wammes JCS, Hayashi RM, et al. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. *Poultry Science*. 2018;97(7):2287–2294. <https://doi.org/10.3382/ps/pey064>
41. Yang Y, Ashworth AJ, Willett C, Cook K, Upadhyay A, Owens PR, et al. Review of antibiotic resistance, ecology, dissemination, and mitigation in U.S. broiler poultry systems. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:2639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02639>
42. Umair M, Orubu S, Zaman MH, Wirtz VJ, Mohsin M. Veterinary consumption of highest priority critically important antimicrobials and various growth promoters based on import data in Pakistan. *PLoS One*. 2022;17(9):e0273821. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0273821>
43. Basit MA, Kadir AA, Loh TC, Aziz SA, Salleh A, Zakaria ZA, et al. Comparative efficacy of selected phytobiotics with halquinol and tetracycline on gut morphology, ileal digestibility, cecal microbiota composition and growth performance in broiler chickens. *Animals (Basel)*. 2020;10(11):2150. <https://doi.org/10.3390/ani10112150>
44. Habib MA, Haque MA, Islam MS, Liton MR. Effect of dietary Halquinol supplementation on the productive performances, carcass traits and blood profile of Sonali chicken. *Asian Journal of Medical and Biological Research*. 2020;5(4):316–323. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v5i4.45270>
45. Díaz Carrasco JM, Redondo EA, Pin Viso ND, Redondo LM, Farber MD, Fernández Miyakawa ME. Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. *BioMed Research International*. 2018;2018:1879168. <https://doi.org/10.1155/2018/1879168>
46. Yu Y, Zhao H, Lin J, Li Z, Tian G, Yang YY, et al. Repurposing non-antibiotic drugs auranofin and pentamidine in combination to combat multidrug-resistant gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2022;59(5):106582. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106582>

47. Aranda MIR, Gómez GAT, De Barros M, Dos Santos MH, De Oliveira LL, Pena JL, et al. Antimicrobial and synergistic activity of 2,2',4-trihydroxybenzophenone against bacterial pathogens of poultry. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00490>
48. Li BB, Zhi LL, Peng ZY, Ma XX, Li J. Contrasting distribution of antibiotic resistance genes and microbial communities in suspended activated sludge versus attached biofilms in an integrated fixed film activated sludge (IFAS) system. *Science of the Total Environment*. 2020;742:140481. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140481>
49. Diarra MS, Silversides FG, Diarrassouba F, Pritchard J, Masson L, Brousseau R, et al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(20):6566–6576. <https://doi.org/10.1128/AEM.01086-07>
50. Yang C, Rehman MA, Yin X, Carrillo CD, Wang Q, Yang C, et al. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens fed encapsulated cinnamaldehyde and citral. *Journal of Food Protection*. 2021;84(8):1385–1399. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-033>
51. Shen W, Chen Y, Wang N, Wan P, Peng Z, Zhao H, et al. Seasonal variability of the correlation network of antibiotics, antibiotic resistance determinants, and bacteria in a wastewater treatment plant and receiving water. *Journal of Environmental Management*. 2022;317:115362. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115362>
52. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2018;42(1):68–80. <https://doi.org/10.1093/femsre/flux053>
53. Xu F, Zeng X, Hinenoya A, Lin J. MCR-1 confers cross-resistance to bacitracin, a widely used in-feed antibiotic. *mSphere*. 2018;3(5):e00411-18. <https://doi.org/10.1128/msphere.00411-18>
54. Frost I, Laxminarayan R, McKenna N, Chai S, Joshi J. World Health Organization. Technical serie on primary health care: Antimicrobial resistance and primary health care. [Internet]. 2018;62p. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/326454/WHO-HIS-SDS-2018.56-eng.pdf>
55. Agga GE, Kasumba J, Loughrin JH, Conte ED. Anaerobic digestion of tetracycline spiked livestock manure and poultry litter increased the abundances of antibiotic and heavy metal resistance genes. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:614424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614424>
56. Ramos PI, Picão RC, Vespero EC, Pelisson M, Zuleta LF, Almeida LG, Gerber AL, Vasconcelos AT, Gales AC, Nicolás MF. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC Microbiology*. 2012, 12:173. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-173>