



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VANESSA LUMI KOGA

**ESTUDO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS E PESQUISA DE GENES DE
VIRULÊNCIA DE *Escherichia Coli* PATOGÊNICA
EXTRAIESTINAL EM AMOSTRAS ISOLADAS DE
CARCAÇAS DE FRANGO**

VANESSA LUMI KOGA

**ESTUDO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS E PESQUISA DE GENES DE
VIRULÊNCIA DE *Escherichia Coli* PATOGÊNICA
EXTRAIESTINAL EM AMOSTRAS ISOLADAS DE
CARCAÇAS DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi

Londrina
2015

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K78eKoga, Vanessa Lumi.

Estudo do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e pesquisa de genes de virulência de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal em amostras isoladas de carcaças de frango / Vanessa Lumi Koga. – Londrina, 2015.
73 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Teses. 2. Virulência (Microbiologia) – Teses. 3. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 4. Bactérias patogênicas – Teses. 5. Aves – Doenças – Teses. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.


CDU 579.842

VANESSA LUMI KOGA

**ESTUDO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
E PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL EM AMOSTRAS ISOLADAS DE
CARCAÇAS DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Microbiologia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito à obtenção do Título de
Mestre em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a Dr^a Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Kelly Cristina Tagliari de Brito
Fundação Estadual de Pesquisa -
Agropecuária FEPAGRO

Londrina, 6 de Março de 2015.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus pela minha vida, por me fortalecer nos momentos de fraqueza, por me capacitar nos momentos de necessidade, por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos e por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida. Obrigada meu Deus!

Agradeço a minha orientadora, prof^a Dr^a Renata K. T. Kobayashi, pela paciência, dedicação e por todos os ensinamentos. Por ter sido quem me incentivou a seguir esse caminho, quem me abriu as portas, e quem me orientou não só para o mestrado mas em várias outras escolhas que tive que fazer. A você toda a minha gratidão, respeito e admiração.

Ao prof. Dr. Gerson Nakazato, pela co-orientação, por todo o apoio no meu trabalho, pelos ensinamentos, revisão dos artigos, ter me acompanhado durante minha defesa de plano, e por ter representado a prof^a Renata durante seu pós-doutorado no Canadá.

À prof^a Dr^a Eliana Vespero pela ajuda no projeto, pelas correções dos artigos, por me acompanhar desde a defesa de plano, por fornecer os primers de resistência aos antimicrobianos, algumas cepas necessárias a nossa pesquisa, e por estar sempre a disposição para nos ajudarmos.

À Dr^a Kelly C. T. de Brito pela ajuda na correção dos artigos e por ter aceitado ser parte da minha banca de defesa.

Ao Dr. Benito G. de Brito e ao Prof^o Dr. Alexandre Oba pela ajuda na correção dos artigos, pelas sugestões e colaboração para a realização desse projeto.

À Ana Paula Streling e sua prof^a Dr^a Ana Cristina Gale por fornecerem algumas cepas necessárias para a padronização do PCR.

À Gabriela R. Rodrigues, pela amizade, por ter me ajudado com o isolamento das amostras de *E. coli*, e por ter me passado toda a técnica de isolamento.

À Sara Scandorieiro pela amizade, pelas várias conversas, e por ter me ajudado com as análises estatísticas dos artigos.

Ao Juan J. P. Sarmiento, Viviane Cardozo e Erick Nishio pela amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, e por sempre estarem me ajudando.

Aos técnicos Osvaldo e Ediel pela amizade, e ajuda com a preparação dos materiais necessários à pesquisa.

Ao Nip3 pela amizade, companheirismo e por permitirem que o nosso laboratório se tornasse um ótimo ambiente de trabalho. Eu admiro muito esse pessoal, que mesmo com os

problemas que enfrentamos no dia a dia no laboratório, são sempre cooperativos, acolhedores, e muito unidos.

Aos meus irmãos por todo o apoio, companheirismo e por toda a ajuda que me deram.

Aos meus pais por todo o apoio, por toda a preocupação, e por todo o conforto que nos proporcionaram para morar aqui em Londrina.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada a todos!!!

KOGA, Vanessa Lumi. **Estudo do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e pesquisa de genes de virulência de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal em amostras isoladas de carcaças de frango**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O uso de antimicrobianos na avicultura, utilizados tanto para fins terapêuticos e profiláticos quanto como promotores de crescimento, tem levado a seleção de cepas resistentes. *Escherichia coli* tem sido utilizada como indicadora de resistência aos antimicrobianos e de patogenicidade na avicultura. Este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e pesquisar genes de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango. Na primeira parte deste trabalho foram estudadas amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango de granja, sendo 84 amostras isoladas em 2007 e 121 amostras isoladas em 2013. Essas amostras foram analisadas quanto a classificação filogenética, presença de genes de virulência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, incluindo pesquisa de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Entre os genes de virulência pesquisados, o gene *iutA* foi o mais prevalente em ambos os grupos de amostras (66.6% em 2007 e 54.5% em 2013). Em 2013 houve um aumento da frequência de resistência para a maioria dos antimicrobianos analisados, além da presença de 39 amostras de *E. coli* produtoras de ESBL. Na segunda parte, foram estudadas 35 amostras de *E. coli* isoladas de frango caipira e 121 amostras de *E. coli* isoladas de frango de granja, isoladas em 2013. Foram analisados quanto a classificação filogenética, genes de virulência, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, incluindo a pesquisa de ESBL e AmpC. Os resultados mostraram que as amostras isoladas de frango de granja apresentam um maior número de fatores de virulência pesquisados e maior frequência de resistência aos antimicrobianos. Apenas as amostras isoladas de frango de granja apresentaram *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC. Diante disso, notamos um aumento na frequência de resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de frangos de granja. O restrito uso de antimicrobianos na produção de frango caipira pela agricultura familiar pode estar relacionada com a baixa frequência de resistência e virulência em bactérias isoladas de carnes de frango.

Palavras chave: *Escherichia coli*. Fatores de virulência. Resistência aos antimicrobianos. ESBL, AmpC

KOGA, Vanessa Lumi. **Study of antimicrobial sensitivity profile and research of virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in strains isolated from chicken carcasses.** 2015. 73 p. Dissertation (Microbiology Master) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

ABSTRACT

The use of antimicrobials in poultry, both as therapeutic and prophylactic and as growth promoters has led to selection of antimicrobial resistant strains. *Escherichia coli* has been used as bio-indicator of antimicrobial resistance and pathogenicity in poultry. This study was aimed the antimicrobial sensitivity profile and search of virulence genes in *E. coli* isolated from chicken carcasses. In the first part, were studied *E. coli* strains isolated from commercial conventional chicken carcasses, being 84 strains isolated in 2007 and 121 strains isolated in 2013. These strains were analyzed for phylogenetic classification, presence of virulence genes and susceptibility to antimicrobials profile, including search of extended spectrum beta-lactamases (ESBL). Among the virulence genes surveyed, the *iutA* gene was the most prevalent in both groups of strains (66.6% in 2007 and 54.5% in 2013). In 2013 there was an increased in the frequency of resistance to majority of antimicrobials tested, and the presence of 39 strains of ESBL-producing *E. coli*. In the second part, we studied 35 strains of *E. coli* from free-range poultry and 121 *E. coli* strains from conventional poultry. They were analyzed for phylogenetic classification, virulence genes, susceptibility to antimicrobials profile, including research to ESBL and AmpC. The results showed that the strains isolated from conventional poultry have a greater number of virulence factors tested and frequency of antimicrobial resistance. Only strains isolated from conventional poultry showed ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Thus, we note an increase in the frequency of antimicrobial resistance of bacteria isolated from commercial conventional poultry. The restricted use of antimicrobials in free-range poultry by family farmers, may be related with the low frequency of antimicrobials resistance and virulence in bacteria isolated from chicken meat.

Keywords: *Escherichia coli*. Virulence factors. Antimicrobial resistance. ESBL. AmpC

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 AVICULTURA NO BRASIL	12
2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA	12
2.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)	15
2.5 RESISTÊNCIA POR BETALACTAMASES	16
2.5.1 BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO	17
2.5.2 AMPC	19
2.6 BETALACTAMASES DE ORIGEM AVIÁRIA	20
2.7 RISCO ZONÓTICO.....	22
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	24
4. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. ARTIGO CIENTÍFICO	33
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1	33
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2	47
6. CONCLUSÕES GERAIS	72

1.INTRODUÇÃO

A modernização e a produção em escala de frangos no Brasil iniciou-se na década de 70, em razão da necessidade de abastecer os mercados na época. Nos anos seguintes, a avicultura brasileira ganhou um grande impulso com os avanços da genética, com o desenvolvimento das vacinas, nutrição e equipamentos específicos para sua criação. Atualmente, o Brasil é considerado o maior exportador mundial de frangos e o terceiro maior produtor de carne de aves, sendo a região sul do Brasil considerada a maior produtora nacional (BELUSSO, 2010; UBABEF, 2013).

Com a intensificação da produção avícola, houve um aumento de doenças microbianas nas aves. No entanto, essas doenças microbianas puderam ser controladas por meio da utilização de antimicrobianos na avicultura, sendo estes utilizados tanto de forma terapêutica e profilática quanto como promotores de crescimento (ARIAS; CARRILHO, 2012).

Várias pesquisas evidenciaram os benefícios promovidos pela utilização de antimicrobianos na alimentação animal, sendo estes administrados como aditivos em ração ou na água de beber das aves de granja, em doses subterapêuticas (GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; PHILLIPS et al., 2004; BRUMANO; GATTÁS, 2009). Porém, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado à seleção de bactérias resistentes (ARIAS; CARRILHO, 2012; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Os produtos de origem animal, principalmente as carnes, são importantes fontes de bactérias responsáveis por enfermidades transmitidas ao homem. Uma das bactérias que tem tido sua virulência associada ao uso de antimicrobianos na avicultura têm sido *Escherichia coli*, que apesar de fazer parte da microbiota normal em aves, podem ser patogênicas para os humanos, podendo a carne de frango e seus derivados serem veículos de transmissão dos mesmos (MANGES; JONHSON, 2012; MELLATA, 2013).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, e é um dos principais constituintes da microbiota intestinal do homem e animais de sangue quente, sendo em aves, habitantes normais do trato gastrointestinal e do trato respiratório superior (faringe e traquéia). No entanto, uma pequena porcentagem de *E. coli* são patogênicas, sendo essas divididas em dois grupos, o grupo das cepas diarreioogênicas, que causam infecções intestinais, e as cepas extraintestinais (ExPEC), capazes de causar diferentes tipos de infecção, entre elas, as septicemias, meningites, infecções do trato urinário, entre outras (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PITOUT, 2012). Já em aves, ExPEC estão entre os principais causadores de enfermidades aviárias (JOHNSON et al., 2008).

De acordo com a classificação filogenética, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos: A, B1, B2 e D. ExPEC pertencem geralmente ao grupo B2, com menor frequência ao grupo D, enquanto as *E. coli* comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). A patogenicidade das ExPEC se deve à presença de genes que codificam fatores de virulência, sendo os principais fatores encontrados os que conferem adesão, como fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria F11 (*felA*), Pili P (*PapC* e *PapG*); resistência à atividade lítica do soro (*iss* e *ompT*); capacidade de multiplicação em ambientes pobres em ferro devido à presença de sideróforo (*iutA*, *iroN*); capacidade de causar lesão tecidual pela hemolisina (*hly*), entre outros fatores (HEIMER et al., 2004; YAMAMOTO, 2007; ZHAO et al., 2009).

Vários estudos tem demonstrado que amostras de *E. coli* de origem aviária apresentam diferentes perfis de resistência múltipla à drogas antimicrobianas, e que são frequentemente resistentes para mais de uma droga (KILONZO-NTHENGE et al., 2008; HASAN et al., 2012). Um dos principais mecanismos de resistência que têm sido encontrados em *E. coli* isoladas de frangos é a produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL), sendo essas enzimas uma das grandes causas de falha terapêutica em tratamentos de infecções bacterianas (EWERS et al., 2012; REICH; ATANASSOVA; KLEIN, 2013; ABREU et al., 2014).

A elevada taxa de resistência aos antimicrobianos, associada aos diversos fatores de virulência tornaram *E. coli* em um potencial problema alimentar, devido a possibilidade de transferência horizontal de genes de virulência e resistência à microbiota residente e/ou à patógenos humanos (ARIAS; CARRILHO, 2012). Isolados de *E. coli* em aves, com potencial patogênico para seres humanos, permanecem um problema importante para os produtores de aves e uma preocupação potencial para os consumidores. Este trabalho tem a finalidade de demonstrar a necessidade de um constante monitoramento quanto a presença de *E. coli* e seus fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, visando o controle da disseminação de enteropatógenos multirresistentes em alimentos de origem animal, e desta forma, minimizar o risco zoonótico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVICULTURA NO BRASIL

A avicultura é uma das atividades que mais tem se desenvolvido no Brasil, e atualmente, nosso país é o maior exportador mundial de frango e o terceiro maior produtor de carne de aves. A região sul do Brasil é responsável pela maior parte da produção de aves, sendo o Paraná referência em sanidade avícola e o maior produtor nacional, responsável por mais de 25% das exportações de carne de frango do país (UBABEF, 2014; SINDIAVIPAR, 2014).

Antes da industrialização da avicultura se consolidar no Brasil, havia o predomínio da avicultura tradicional e familiar, conhecida popularmente como a produção do frango “caipira”. Nesse sistema de produção, as propriedades produziam carne e ovos para o consumo próprio, e comercializavam os excedentes (CIAS – EMBRAPA, 2010).

A partir da década de 70 a avicultura industrial passou a se desenvolver de forma mais efetiva. Esse crescimento foi consequência direta do melhoramento genético, desenvolvimento de vacinas, e avanços na nutrição e equipamentos específicos para sua criação (BELUSSO, 2010).

Em 2013, a produção brasileira foi responsável por 12,3 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que dessa produção 68,4% são destinados ao mercado interno e 31,6% às exportações. Atualmente, o consumo per capita de carne de frango no Brasil é de 41,8 quilogramas por habitante/ ano (UBABEF, 2014).

Nas últimas décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de produção. O progresso desse setor possibilitou à indústria avícola a conquista de um espaço significativo na produção mundial, sendo atualmente a carne nacional exportada a 142 países (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

Diante do aumento no consumo de carne de frango e a competitividade com mercados externos, as decisões em torno das estratégias nutricionais foram fundamentais para interferir no desempenho da produção (PESSÔA et al., 2012).

Na avicultura, além de fontes de energia, proteínas, minerais e vitaminas, são utilizados nas rações outros ingredientes, como os aditivos. Entre os diversos tipos de aditivos, os antimicrobianos são utilizados como promotor de crescimento para melhorar o

desempenho das aves, porém também para a prevenção e profilaxia das doenças (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

Várias pesquisas evidenciam os benefícios da utilização de antibióticos na alimentação animal, sendo estes administrados como aditivos em ração ou na água de beber das aves de granja, em doses subterapêuticas (GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; PHILLIPS et al., 2004; BRUMANO; GATTÁS, 2009).

O uso de antimicrobianos tem proporcionado às aves: proteção do bem-estar animal, aumento do ganho de peso, diminuição do tempo necessário para o abate, diminuição do consumo de ração, aumento da eficiência alimentar, conservação das rações, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas e diminuição da mortalidade. Estes benefícios tem tornado a produção animal mais eficiente, e reduziu os custos de produção (BRUMANO; GATTÁS, 2009; ARIAS; CARRILHO, 2012).

Na terapêutica, os antimicrobianos são utilizados em animais de produção principalmente para o tratamento de doenças gastroentéricas, respiratórias, cutâneas e reprodutivas (ARIAS; CARRILHO, 2012).

Os antimicrobianos, utilizados como promotores de crescimento, atuam diretamente na microbiota intestinal diminuindo a competição por nutrientes e reduzindo a síntese de metabólitos microbianos que interferem no crescimento do animal, e agem também na destruição de bactérias patogênicas do trato gastrointestinal dos animais de produção, resultando em uma melhora da digestibilidade dos alimentos e metabolismo dos nutrientes. Atualmente, os principais promotores de crescimento autorizados no Brasil são: ácido 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, colistina, flavomicina, lincomicina, nitrovin, tilosina, virginiamicina, bacitracina de zinco e enramicina (BRASIL, 2004; BRUMANO; GATTÁS, 2009; ARIAS; CARRILHO, 2012).

No entanto, o uso incorreto, abusivo e indiscriminado de antibióticos na medicina animal, e o seu uso durante algum tempo na agropecuária como promotores de crescimento, tem levado ao aparecimento e disseminação de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos. Isso tem sido preocupante, devido ao potencial para disseminação na comunidade por meio de contato direto e consumo de alimentos contaminados, podendo ainda se estabelecer nos ecossistemas (MANGES; JONHSON, 2012; MELLATA, 2013). Além disso, muito promotores de crescimento são análogos ou apresentam resistência cruzada com antimicrobianos utilizados na terapêutica humana, como por exemplo o glicopeptídeo avoparcina e os antimicrobiano vancomicina, o que também pode interferir no aumento de bactérias resistentes (BRUMANO; GATTÁS, 2009; ARIAS; CARRILHO, 2012).

Vários estudos têm relatado o aumento da resistência aos antimicrobianos em diversas espécies animais, sendo que muitos desses microrganismos apresentam resistência aos mesmos antimicrobianos utilizados nos tratamentos humanos, o que é preocupante, pois as bactérias isoladas de animais podem ser reservatórios de genes de resistência, podendo ocorrer a disseminação de resistências às bactérias patogênicas e comensais humanas (MANGES; JONHSON, 2012; MELLATA, 2013).

Desde 2006, na Europa, está proibido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (CASTANON, 2007). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a cada ano vêm restringindo o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, sendo proibido o uso de antimicrobianos como tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, penicilinas, entre outros (BRASIL, 2003; 2009). Muitas empresas de agroindústrias nacionais acataram adicionalmente as proibições que vigoram em outros países, como os países da União Européia, como forma de continuar atendendo os mercados internacionais (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

2.3 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, com metabolismo anaeróbico facultativo. São móveis (flagelo peritríqueos) e imóveis, não esporulam, integram o grupo dos microrganismos coliformes, cuja presença na água e alimentos indicam contaminação fecal. É um dos principais constituintes da microbiota intestinal do homem e animais de sangue quente, sendo em aves, habitantes normais do trato gastrointestinal e do trato respiratório superior (faringe e traquéia), podendo ainda ser isolada da pele e das penas, dependendo do nível de contaminação do ambiente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PITOUT, 2012).

Uma pequena porcentagem de *E. coli* são patogênicas, sendo essas divididas em dois grupos, o grupo das cepas diarreio gênicas, que causam infecções intestinais, e as cepas extraintestinais (ExPEC), capazes de causar diferentes tipos de infecção, entre elas, infecções da corrente sanguínea, meningites, infecções do trato urinário, entre outras. Já em aves, ExPEC estão entre os principais causadores de enfermidades aviárias, conhecidas como *E. coli* patogênica aviária (APEC) (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; PITOUT, 2012).

De acordo com a classificação filogenética, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos: A, B1, B2 e D. ExPEC pertencem geralmente ao grupo B2, e com menor frequência ao grupo D, enquanto *E. coli* comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)

Entre *E. coli* causadoras de doenças extraintestinais, há as linhagens de *E. coli* patogênica para aves (APEC). Apesar de ser um colonizante normal da microbiota das aves, *E. coli* pode apresentar inúmeros fatores de virulência que conferem a ela a capacidade de causar infecções extraintestinais, entre elas a colibacilose aviária (JOHNSON et al., 2008).

A colibacilose é uma doença freqüente responsável por altos prejuízos para a indústria aviária. A doença pode instalar-se em diferentes locais anatômicos da ave, sendo as principais manifestações: doenças respiratórias, que frequentemente culmina em septicemia, celulite, síndrome da cabeça inchada, onfalite, salpingite, entre outros. O aparecimento da colibacilose depende da interação de vários fatores como: microrganismo, manejo, alimentação, instalações e condição do animal (DZIVA; STEVENS, 2008).

Dentre os principais fatores de virulência encontrados em APEC estão os relacionados ao sistema de captação de ferro (*fyuA*, *iutA* e *iroN*), resistência lítica ao soro (*iss*), proteases (*ompT*) e toxinas (*hlyF*) (JOHNSON et al., 2008).

A aquisição de ferro é um importante fator de virulência para as bactérias, pois o ferro é um co-fator essencial para a multiplicação bacteriana, e também é importante em alguns processos biológicos como na produção de energia e transporte do oxigênio. Devido a baixa concentração de ferro nos locais de infecção extraintestinal, as ExPEC apresentam uma alta prevalência de fatores envolvidos na captação de ferro, como os sideróforos (enterobactina, aerobactina, entre outros), que promovem o seqüestro e a aquisição através da remoção do ferro de proteínas carreadoras (DZIVA; STEVENS, 2008; JOHNSON et al., 2008).

Alguns microrganismos possuem também fatores de virulência que os capacitam a escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Entre esses fatores há as proteínas de membrana, codificado pelo gene *iss*. Esta proteína age bloqueando a ligação do complexo do complemento à superfície celular bacteriana, impedindo a lise bacteriana por ação do sistema complemento. Essa característica permite que a bactéria possa sobreviver nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (DZIVA; STEVENS, 2008; JOHNSON et al., 2008).

O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em amostras de APEC, por ser uma hemolisina aviária, apesar de também ser encontrada em ExPEC humanas. A hemolisina é uma endotoxina produzida por linhagens de *E. coli* e tem a capacidade de formar poros na membrana celular em diferentes tipo de células, levando à morte celular, e dessa forma disponibilizando o íon ferro para o microrganismo (JOHNSON et al., 2008; KOGA et al., 2014).

Já a proteína *ompT* está localizada na membrana externa da parede bacteriana e tem sido caracterizado como um ativador do plasminogênio, e também capaz de degradar peptídeos antimicrobianos catiônicos (JOHNSON et al., 2008).

Recentemente foi descrita uma região plasmidial denominada “Conserved Virulence Plasmidic” (CVP), sendo esta uma região que apresenta 8 operons ou genes, relacionados a codificação de sistemas sideróforos (genes *iroN*, *iuc* e *sit*), proteína de membrana externa (gene *ompT*), colicina V (gene *cva*), α -hemolisina (gene *hlyF*), sistema de secreção tipo I (gene *ets*) e gene relacionado a resistência sérica (gene *iss*). Essa região CVP pode ser encontrada em cepas de APEC, distribuída nos 4 grupos filogenéticos (LEMAÎTRE et al., 2013).

2.5 RESISTÊNCIA POR BETALACTAMASES

Os betalactâmicos encontram-se entre os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções por Enterobacteriaceae, este grupo inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. No entanto, uma das limitações no tratamento com betalactâmicos é devido ao aumento de bactéria produtoras de betalactamases. A produção de betalactamases por bactérias Gram-negativas causadores de infecções hospitalares é a maior causa de falha terapêutica, restando poucas alternativas terapêuticas, visto que estas bactérias acumulam frequentemente resistência a outras famílias de antibióticos (DHILLON; CLARK, 2011; PITOUT, 2012).

As betalactamases são enzimas hidrolíticas que clivam o anel betalactâmico, através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel, conferindo resistências aos antimicrobianos dessa classe (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Diferentes famílias de betalactamases têm sido descritas de acordo com a constituição química do seu local ativo e a capacidade hidrolítica sobre os diferentes betalactâmicos (DHILLON; CLARK, 2011).

Atualmente as betalactamases são classificadas segundo dois esquemas gerais: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby. O esquema proposto por Bush-Jacoby baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação diante de inibidores específicos (BUSH; JACOBY, 2010). O esquema de classificação de Ambler considera a similaridade entre a estrutura e sequência de aminoácidos das enzimas, e elas foram agrupadas nos tipos A, B, C e D (DHILLON; CLARK, 2011).

A primeira beta-lactamase foi identificada em uma *E.coli* (SILVA; LINCOPAN, 2012). Em 1983, foi descrita a primeira beta-lactamase de espectro estendido

(“Extended-spectrum β -lactamases” ou ESBL) em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*. O surgimento destas enzimas veio em resposta à introdução das cefalosporinas de terceira geração no início dos anos 80, exemplificando a capacidade de adaptação apresentada por patógenos causadores de infecções hospitalares (PITOUT, 2012).

2.5.1 BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO

As ESBL apresentam a capacidade de hidrolisar as penicilinas, as cefalosporinas de primeira, terceira e quarta geração e o aztreonam, e são inibidas pelos inibidores das beta-lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Porém não possuem atividade contra as cefamicinas, como cefoxitin e cefotetan. Estas enzimas pertencem ao grupo 2be e 2d de Bush-Jacoby e ao grupo A de Ambler, com exceção das OXA (BUSH; JACOBY, 2010; DHILLON; CLARK, 2011).

Atualmente, patógenos produtores de ESBL são a maior causa de falha terapêutica com cefalosporinas, porque isolados clínicos identificados como sensíveis passam a produzir ESBL durante a terapêutica antimicrobiana (PITOUT, 2012).

O isolamento de ESBL é descrito em diversos patógenos da família Enterobacteriaceae, de origem hospitalar e comunitária, principalmente em *Klebsiella* spp. e *E. coli*, porém também pode estar presente em *Salmonella enterica*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*, entre outros (SILVA; LINCOPAM, 2012).

Frequentemente, as ESBL são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, os quais também carregam genes de resistência a outras classes de antibióticos, de modo que o isolamento de cepas produtoras de ESBL multirresistentes tem levado ao aumento considerável de morbidade por infecções bacterianas (PITOUT; LAUPLAND, 2008; BONNET, 2004).

As ESBL mais comuns são as da família SHV, TEM e CTX-M. Outros tipos clinicamente importantes incluem VEB, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA e IBC (DHILLON; CLARK, 2011).

A primeira betalactamase codificada por um elemento genético móvel foi a enzima TEM-1, isolada de uma *E. coli*. As ESBL do tipo TEM e SHV são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM-1 e TEM-2 e SHV-1, codificadas por genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. Atualmente, ESBL tipo TEM e SHV são de ocorrência mundial, e foram descritas inclusive no Brasil. A produção de várias dessas enzimas por genes localizadas em plasmídeos e

transposons levou a uma rápida disseminação de genes de resistência à várias espécies da família Enterobacteriaceae (CANTÓN et al., 2008).

As betalactamases do tipo CTX-M não apresentam relação próxima com as ESBL do tipo TEM ou SHV, e devido a similaridade com os genes cromossomais do gênero *Kluyvera* acredita-se que se originaram da aquisição de um plasmídeo com um gene cromossomal pré-existente em *Kluyvera spp.* A primeira CTX-M foi isolada na Alemanha em 1989, em um isolado clínico de *E. coli* e denominada CTX-M-1. Atualmente as CTX-M são as ESBL mais prevalentes em espécies da família Enterobacteriaceae. Esta predominância é observada não apenas entre isolados clínicos hospitalares, mas também entre bactérias multirresistentes isoladas de infecções comunitárias (BONNET, 2004; CANTÓN et al., 2008).

No Brasil, a ocorrência de CTX-M foi relatada pela primeira vez na década de 1990, onde foi descrita uma nova CTX-M (CTX-M-8) produzida por isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus* (BONNET et al., 2000).

As enzimas CTX-M, são agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. O grupo CTX-M-1, inclui as enzimas CTX-M-3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, 29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31, -44. O grupo CTX-M-8 inclui as enzimas CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63. O grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45, -46, -47, -48, -49 e -50. O grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39 e -41 (BONNET, 2004; CANTÓN; COQUE, 2006).

As enzimas CTX-M apresentam uma alta capacidade de disseminação, devido aos elementos genéticos móveis que carregam os genes bla_{CTX-M} , e sua alta prevalência não só em ambiente hospitalar, mas também na comunidade, o que explica seu perfil pandêmico. A mobilização e disseminação destes genes são mediadas por pelo menos duas sequências de inserção bem caracterizadas, ISEcp1 e ISCR1. Além disso, a co-existência nos integrons de genes que codificam outras ESBL (bla_{SHV} e bla_{TEM}), e para a resistência a outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos (*aac* ou *aad*), fluoroquinolonas (PMQR), sulfas (*sul1*), favorece sua manutenção em função da pressão seletiva exercida pela ampla terapia antimicrobiana e procedimentos de desinfecção (CANTÓN et al., 2008).

Ainda de acordo com a família CTX-M, as betalactamases mais frequentemente isoladas em território brasileiro incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9. No Brasil, a produção de ESBL em Enterobacteriaceae também é alarmante, uma vez que

variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB têm sido descritas (SILVA; LINCOPAM, 2012).

2.5.2 AMPC

As beta-lactamases tipo AmpC são enzimas que podem induzir resistência às cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, às cefamicinas, como cefoxitina e cefotetan. Pertencem ao grupo 1na classificação de Bush-Jacoby e ao grupo C na classificação de Ambler (JACOBY, 2009; BUSH; JACOBY, 2010; DHILLON; CLARK, 2011).

Estas enzimas são produzidas por genes de localização cromossômica ou plasmidial. Quando a localização é cromossômica, há a presença de genes acessórios e reguladores e estão presentes em diversas bactérias, como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, e *Hafnia alvei*. Nesses microrganismos, a produção da enzima é induzível, sendo produzidas em quantidade insignificante na ausência de betalactâmicos, e em grandes quantidades quando eles estão presentes (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002; JACOBY, 2009).

Quando a localização é plasmidial ou por outros elementos transferíveis, são chamados de AmpC mediadas por plasmídeos. Grande parte dos genes que codificam AmpC plasmidial principalmente em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, além de outros gêneros, a expressão de AmpC não é induzível, mas é regulada por promotores e mecanismos de atenuação (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

Os genes AmpC plasmidiais são derivados dos genes cromossômicos de várias espécies da família Enterobacteriaceae. Estão normalmente localizados em integrons de classe I, em plasmídeos onde também estão genes que determinam a resistência para outras drogas como quinolonas, sulfas, aminoglicosídeos e cloranfenicol, além de genes para a produção ESBL tipo TEM, SHV e CTX-M. Devido a este ambiente genético, estes genes se disseminam facilmente através de transmissão horizontal, e cepas produtoras de AmpC são normalmente multirresistentes e encontram-se disseminadas não somente em ambiente hospitalar mas também na comunidade (JACOBY, 2009).

As enzimas tipo AmpC mediadas por plasmídios são conhecidas desde 1989. Atualmente, são descritas 6 diferentes grupos, denominadas CIT, MOX, EBC, FOX, DHA e ACC. São conhecidas 131 variedades de CMY, 12 de FOX, 5 de ACC, 11 de MOX e 23 de DHA (JACOBY, 2009; LAHEY CLINIC, 2013). CMY-2, é a AmpC mediada por plasmídios mais comumente encontrada entre membros da família Enterobacteriaceae. Recentemente,

CMY-2 foi identificada em *Klebsiella pneumoniae* isolada de um paciente internado em um hospital brasileiro (CAMPANA et al., 2013).

Nos manuais de determinação de sensibilidade, como o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) não há uma padronização de testes para detectar as bactérias produtoras de AmpC. A dificuldade de detecção fenotípica das cepas produtoras de AmpC impede a estimativa da prevalência destas enzimas, sendo uma barreira para o controle da sua disseminação (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

Por isso, a investigação molecular da produção de AmpC plasmidial é um importante instrumento para se conhecer a diversidade dos mecanismos de resistência apresentados por cepas de importância clínica.

2.6 BETALACTAMASES DE ORIGEM AVIÁRIA

O uso intensivo de antimicrobianos na produção animal, de forma profilática e terapêutica, ou mesmo como promotores de crescimento, é descrito como uma das principais causas de seleção de resistência em enteropatógenos (SILVA; LINCOPAM, 2012).

Amostras de *E. coli* produtoras de ESBL/AmpC estão recentemente sendo encontrados em grande números em animais de produção (EWERS et al., 2012; REICH; ATANASSOVA; KLEIN, 2013; ABREU et al., 2014). Um dos primeiros relatos da identificação de ESBL em animais foi da presença de *E. coli* produtora de SHV-12 de um cachorro com infecção do trato urinário, em 1998 (ABREU et al., 2014). Já em aves, o primeiro relato de betalactamases foi na Espanha entre os anos de 2000 e 2001, na qual, foram encontradas *E. coli* produtoras de CTX-M-14, SHV-12 e CMY-2 (EWERS et al., 2012). Desde então, houve um grande aumento na detecção de ESBL em amostras de *E. coli* isolados de animais destinados ao consumo humano (AIDARA-KANE; ANDREMONT; COLLIGNON, 2013; ABREU et al., 2014). Ewers e colaboradores (2012) relatam que a distribuição de ESBL entre diferentes animais de diferentes países não apresentam uma similaridade de prevalência, e que o tipo de ESBL predominante em animais dificilmente apresenta o mesmo perfil em humanos, que habitam na mesma região.

Assim como em humanos, as ESBL do tipo CTX-M também são as mais prevalentes em bactérias isoladas de animais, embora também haja relatos da presença de *bla*_{TEM-52} e *bla*_{SHV-12}, além de outros genes (EWERS et al., 2012; REICH; ATANASSOVA; KLEIN, 2013).

De acordo com um recente estudo realizado na Holanda, a carne de frango apresenta uma maior prevalência de contaminação por bactérias produtoras de ESBL do que em outras carnes, além de apresentar genes de ESBL similares aos encontrados em microrganismos que colonizam e causam infecções em humanos (OVERDEVEST et al., 2011).

No Canadá, a emergência de ESBL em bactérias isoladas de carcaças de frango foram relacionadas ao uso de ceftiofur (cefalosporina de 3ª geração) injetados em ovos para controlar infecções por *E. coli*, como a onfalite, em frangos (DUTIL et al., 2010; MELLATA, 2013).

Um estudo realizado em 2008, no Reino Unido (WARREN et al., 2008) reportou o isolamento de *E. coli* isoladas de frangos importados do Brasil com produção de CTX-M-2. Recentemente, também foi constatado a presença de CTX-M-2 em *Salmonella enterica* isoladas de produtos de origem avícola em diferentes estados brasileiros, inclusive Paraná e Santa Catarina, os maiores produtores de carne de frango do país (FERNANDES et al., 2009; SILVA; LINCOPAM, 2012).

Entre AmpC, o gene *bla*_{CMY-2} tem sido o mais comumente encontrado, sendo os outros tipos raramente identificados (EWERS et al., 2012; BÖRJESSON et al., 2013; REICH; ATANASSOVA; KLEIN, 2013). No Brasil, ainda não há relatos da prevalência de *E. coli* produtoras de AmpC em alimentos de origem animal.

Muitos estudos têm demonstrado que frangos originados da agricultura familiar, ou até mesmo os orgânicos apresentam menores frequências de resistência aos antimicrobianos, sendo poucos os relatos da presença de bactérias produtoras de ESBL nessas carnes (AIDARA-KANE; ANDREMONT; COLLIGNON, 2013; ROSSA et al., 2013). A baixa frequência de resistência nesse sistema de criação pode estar relacionada ao uso restrito, ou até mesmo ausente, de antibióticos, além da própria forma de criação, visto que essas aves são muitas vezes criadas soltas, diferentemente das de granja que são criados em pequenos espaços facilitando a transmissão de genes de resistência entre as bactérias (EWERS et al., 2012). No entanto, recentes estudos tem detectado a presença de *E. coli* produtora de ESBL no ambiente e em animais selvagens, principalmente em aves (GUENTHER; EWERS; WIELER, 2011; MELLATA, 2013).

Assim, a presença de patógenos produtores de ESBL em alimentos de origem animal é alarmante, devido ao risco de transferência horizontal entre isolados aviários e humanos, sendo essas enzimas uma das grandes causas de falha terapêutica em tratamentos de infecções bacterianas (SILVA; LINCOPAM, 2012).

2.7 RISCO ZONÓTICO

Muitos estudos tem demonstrado uma alta similaridade entre APEC e as outras linhagens de ExPEC, como as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* de meningite neonatal (NMEC), em relação às características de virulência, grupos filogenéticos e um comportamento semelhante quando estabelecem infecções em locais extraintestinais. Isso sugere que pode haver pouca ou nenhuma dependência de especificidade ao hospedeiro entre as *E. coli* humanas e aviárias, demonstrando um possível risco zoonótico (ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010; BAUCHART et al., 2010). Vários reservatórios potenciais para ExPEC tem sido descritos em estudos de epidemiologia molecular, incluindo o trato intestinal humano além de vários reservatórios não humanos como produtos cárneos de varejo, animais de companhia e outras fontes ambientais (MANGES; JOHNSON, 2012).

Os produtos de origem animal, principalmente as carnes, são importantes fontes de bactérias responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos, sendo a carne de frango uma das carnes com maiores níveis de contaminação por *E. coli*, e considerada a fonte de origem alimentar animal mais relacionada com a ExPEC humana, (MANGES; JOHNSON, 2012). A intensificação da produção na avicultura, juntamente com o consumo exagerado dos antimicrobianos aumentou o risco de disseminação de doenças infecciosas de grande impacto econômico, sendo que algumas bactérias, como *E. coli*, que apesar de fazer parte da microbiota normal em aves, podem ser patogênicas para os humanos, podendo a carne de frango e seus derivados serem veículos de transmissão dos mesmos (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). De acordo com Mellata (2013), um estudo recente sobre o risco zoonótico de ExPEC levaram ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC) a liberar relatórios de informação ao público sobre o potencial zoonótico de ExPEC e sua eventual transmissão através de carne de frango.

Muitos estudos têm demonstrado que as bactérias isoladas de carcaça de frango apresentam genes que codificam fatores de virulência semelhantes aos encontrados em APEC e ExPEC humanas. Visto que a carne de frango é uma das carnes que mais apresentam bactérias resistentes aos antimicrobianos, estes podem servir como reservatórios de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). A transmissão dessas bactérias pode ocorrer pelo consumo da carne de frango, contaminação em utensílios utilizados no preparo desses produtos, pelo consumo de vegetais fertilizados com adubo orgânico advindo de aves tratadas terapêuticamente ou profilaticamente com antimicrobianos, contaminação no ambiente, entre outras formas (BÉLANGER et al., 2011).

Johnson e colaboradores (2005) demonstraram que 92% das amostras de carne de frango estavam contaminadas com *E. coli*, e que 46% das amostras apresentavam fatores de virulência associados a ExPEC. Estudos também sugerem que cepas de APEC são patógenos zoonóticos, e que estes poderiam servir como reservatórios de genes de virulência e resistência aos humanos (ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010). Já Bergeron e colaboradores (2012) verificaram que amostras de *E. coli* da carne de frango eram significativamente mais relacionados as amostras de *E. coli* uropatogênica (UPEC) isoladas de infecções urinárias humanos do que amostras da carne bovina e suína, na qual, apresentavam o mesmo grupo filogenético e as mesmas sequências de MLST (multilocus sequence typing), indicando que podem ter se originado a partir de um ancestral em comum. Outros autores também encontraram uma alta similaridade entre *E. coli* isoladas de carne de frango com UPEC (KYLIE et al., 2005; BAUCHART et al., 2010).

Estudos demonstram que *E. coli* do grupo B2 isoladas de carcaças de frango e do intestino de galinhas saudáveis eram capazes de causar infecções em camundongos (JAKOBSEN et al., 2010; MELLATA, 2013). Em 2010, Johnson e colaboradores descreveram o plasmídio pAPEC – O103 – ColBM, presente em APEC. Este plasmídio além de apresentar genes de resistência aos antimicrobianos, também apresenta genes que codificam fatores de virulência capazes de causar septicemias em aves, bacteremia e meningite em ratos, (modelo de doença em humano) e resistência a atividade bactericida do soro humano.

Outra possível relação entre ExPEC humanas e APEC, ou *E. coli* isolados de frangos, é o padrão semelhante de resistência aos antimicrobianos entre as *E. coli* dessas fontes. Recentes estudos têm identificado uma alta similaridade entre as *E. coli* produtoras de ESBL em humanos e em carnes de frango, indicando os alimentos de origem animal como possíveis reservatórios de ESBL (DIERIKX et al., 2012; ABREU et al., 2014). Um estudo realizado na Holanda, encontrou uma alta prevalência de amostras produtoras de ESBL/AmpC isoladas de frangos, e mostrou que muitos dos trabalhadores dessas produções apresentavam bactérias produtoras de betalactamases similares aos animais criados por eles (DIERIKX et al., 2012).

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ABREU, R. et al. Prevalence of CTX-M-Type extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in poultry farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.11, p.868 – 873, set. 2014.
2. AIDARA-KANE, A.; ANDREMONT, A.; COLLIGNON, P. Antimicrobial resistance in the food chain and the AGISAR initiative. **Journal of Infection and Public Health**, v.6, n. 3, p. 162 – 165, abr. 2013.
3. ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775 – 790, abr. 2012.
4. BAUCHART, P. et al. Pathohgenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. **Microbial Pathogenesis**, v.49, n. 3, p. 105 – 115, mai. 2010.
5. BÉLANGER, L. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.62, n. 1, p. 1 – 10, mar. 2011.
6. BELUSSO, D. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso – NEMO**, v.2, n.1, p. 25 – 51, 2010.
7. BERGERON, C.R. et al. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415 - 421, mar. 2012.
8. BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1 – 14, jan. 2004.
9. BONNET, R. et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.7, p. 1936 – 1942, jul. 2000.

10. BÖRJESSON, S. et al. Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2463 – 2466, jan. 2013.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20-%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos>. Acesso em: 30 jan. 2014.
12. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
13. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. 2009. Disponível em :<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
14. BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 3, p. 953 – 959, mai/jun. 2009.
15. BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p. 969 – 976, mar. 2010.

16. CAMPANA, E.H. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n.2, p. 477 – 480, jun. 2013.
17. CANTÓN, R.; COQUE, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466 – 475, ago. 2006.
18. CANTÓN, R. et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, suppl. 1, p. 144 – 153, jan. 2008.
19. CASTANON, J.I.R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466 - 2471, nov. 2007.
20. CIAS – Central de Inteligência de Aves e Suínos - Embrapa. A avicultura no Brasil. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=15>. Acesso em 30 jan. 2014.
21. CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555 – 4558, out. 2000.
22. DHILLON, R.H.-P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1 - 11, abr. 2011.
23. DIERIKX, C. et al. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 1 – 8, set. 2012.
24. DUTIL, L. et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enteric* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 48 - 54, jan. 2010.

25. DZIVA, F.; STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 355 – 366, ago. 2008.
26. EWERS, C. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 646 – 655, mar. 2012.
27. FERNANDES, S.A. et al. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 317 - 321, 2009.
28. GASKINS, H.R.; COLLIER, C.T.; ANDERSON, D.B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 29 - 42, jul. 2002.
29. GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L.H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology**, v.2, p. 1 – 13, 2011.
30. HASAN, B., et al. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n.12, p. 2055 - 2058, dez. 2012.
31. HEIMER, S.R., et al. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 593 - 597, jan. 2004.
32. JACOBY, G.A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161 – 182, jan. 2009.
33. JAKOBSEN, L. et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 264 – 272, jul. 2010.

34. JOHNSON, J.R. et al. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 7, p. 1040 – 1049, mar. 2005.
35. JOHNSON, T.J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987 - 3996, out. 2008.
36. JOHNSON, T.J. et al. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1931 – 1942, fev. 2010.
37. KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123 – 140, fev. 2004.
38. KILONZO-NTHENGE, A., et al. Prevalence and antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in chicken and guinea fowl. **Poultry Science**, v. 87, p. 1841 – 1848, mai. 2008.
39. KOGA, V.L. et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. **Biomed Research Internacional**, v. 2014, p. 1 -9, abr. 2014.
40. KÖHLER, C.-D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 2011, p. 642 – 647, 2011.
41. KYLIE, E.R.-S. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, pt. 6, p. 2097 – 2110, abr. 2005.
42. **Lahey Clinic**. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>>. Acesso em: 11 fev 2015.

43. LEMAÎTRE, C. et al. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1 – 10, sep. 2013.
44. MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712 – 719, sep. 2012.
45. MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916 - 932, 2013.
46. **Ministério da Agricultura**, 2014. Aves. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
47. OVERDEVEST, I. et al. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1216 – 1222, jul. 2011.
48. PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid-mediated ampC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153 – 2162, jun. 2002.
49. PESSÔA, G.B.S. et al. Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 755 – 774, jul/set. 2012.
50. PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28 – 52, dec. 2004.
51. PITOUT, J.D.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet*. **Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159 – 166, mar. 2008.

52. PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 1 – 7, jan. 2012.
53. REICH, R.; ATANASSOVA, V.; KLEIN, G. Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing Enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1253 – 1259, ago. 2013.
54. ROSSA, L.S. et al. Resistência antimicrobiana e ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 211 – 220, set. 2013.
55. SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91 – 99, abr. 2012.
56. **SINDIAVIPAR** – Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Disponível em: <http://sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=159559> >. Acesso em: 08 jan. 2014.
57. TIVENDALE, K.A. et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3412 – 3419, may 2010.
58. União Brasileira de Avicultura (UBABEF) – **Brazilian Poultry Association**. Relatório Anual 2013 – Annual Report 2013. Disponível em: <www.ubabef.com.br>. acesso em: 30 jan. 2014.
59. WARREN, R.E. et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 504 - 508, jan. 2008.
60. YAMAMOTO, S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.13, n. 2, p.68-73, 2007.

61. ZHAO, L. et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, pt. 5, p. 1634 - 1644, fev. 2009.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes codificadores de fatores de virulência em *Escherichia coli* isolada de carcaças de frango

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de genes codificadores de fatores de virulência característicos de ExPEC em amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango e classificá-las filogeneticamente;
- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras isoladas;
- Comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes codificadores de fatores de virulência entre amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango entre os anos de 2007 e 2013;
- Comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes codificadores de fatores de virulência entre as amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango de granja com as amostras isoladas de carcaças de frango “caipira”.

5.ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Enviado para a revista “Foodborne Pathogens and Disease” em 01 de outubro de 2014.

Comparison of antibiotic resistance and virulence profile of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil

Vanessa L. Koga¹, Gabriela R. Rodrigues¹, Sara Scandorieiro¹, Eliana C. Vespero², Alexandre Oba³, Benito G. de Brito⁴, Kelly C. T. de Brito⁴, Gerson Nakazato¹, Renata K. T. Kobayashi^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

²Departamento de Patologia e Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

³Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

⁴Laboratório de Saúde das Aves, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) – Fepagro Saúde Animal, Rio Grande do Sul, Brasil

*Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia - CCB. Campus

Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Caixa Postal 6001, 86051-980, Londrina, Paraná,

Brazil. Tel. 55(43)33714396, Fax number.55(43)33714788.

Email: kobayashirkt@uel.br

Abstract

The indiscriminate use of antimicrobials in commercial poultry production has raised concerns regarding on human health due to selection for resistant and pathogenic bacteria. Recent studies have reported similarities between extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains isolated from birds and humans, indicating that these contaminant bacterial in poultry may be linked to human disease. The aim of our study was to analyze the frequency of antimicrobial resistance and virulence factors among *E. coli* strains isolated from commercial chicken carcasses in Paraná, Brazil, in 2007 and 2013. A total of 84 *E. coli* strains were isolated from chicken carcasses in 2007, and 121 *E. coli* strains were isolated in 2013. Polymerase chain reaction was used to detect virulence genes (*hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN* and *iutA*) and to determine phylogenetic classification. Antimicrobial susceptibility testing was performed using 15 antimicrobials. The strains were also confirmed as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* with phenotypic and genotypic tests. The results indicated that our strains harbored virulence genes characteristic of ExPEC, with the *iutA* gene being the most prevalent. The phylogenetic groups D and B1 were the most prevalent among the strains isolated in 2007 and 2013, respectively. There was an increase in the frequency of resistance to a majority of antimicrobials tested. An important finding in this study was the large number of ESBL-producing *E. coli* strains isolated from chicken carcasses in 2013, primarily for the group 2 cefotaximase (CTX-M) enzyme. ESBL production confers broad-spectrum resistance and is a health risk because ESBL genes are transferable from food-producing animals to humans via poultry meat. These findings suggest that our strains harbored virulence and resistance genes, which are often associated with plasmids, that can facilitate their transmission between bacteria derived from different hosts, indicating zoonotic risks.

Keywords: Poultry, *E. coli*, antimicrobial resistance, virulence markers, human foodborne pathogen

Introduction

The use of antimicrobial agents has brought many benefits for animal production. But, the indiscriminate use of antimicrobials have increases antimicrobial-resistant bacteria, both in humans and animals, and generated significant concern regarding food quality (Dierikx *et al.*, 2012; Asai *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014).

Chicken products are suspected to be sources of foodborne pathogens and/or antimicrobial-resistant bacteria for humans (Marshall and Levy, 2011; Johnson *et al.*, 2012; Mellata, 2013; Asai *et al.*, 2014). Multi-resistant bacteria are frequently found in poultry (Dierikx *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012). Their presence can be caused by selection pressure on bacteria due to the indiscriminate use of antimicrobials in aviculture as feed additives or as therapy (Marshall and Levy, 2011; Asai *et al.*, 2014).

Escherichia coli is commonly found in the gastrointestinal tracts of animals and can be used as a bio-indicator of antimicrobial resistance (Jiang *et al.*, 2011). A small percentage of *E. coli* strains are capable of causing diseases and can be subdivided into the following groups: (i) intestinal non-pathogenic (commensal isolates), (ii) diarrheagenic *E. coli* (DEC), and (iii) extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (Pitout, 2012). ExPECs strains are characterized by the possession of many virulence factors that are distinct from commensal and diarrheagenic *E. coli*, and according to phylogenetic classification, these bacteria can belong to group B2 or less commonly to group D, whereas commensal intestinal strains belong to group A or B1 (Clermont *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2008).

Avian and human ExPEC strains demonstrate similar characteristics in terms of virulence genes, phylogenetic groups and common behavior in response to body temperature when establishing infections in extraintestinal locations. This leads to the hypothesis that avian *E. coli* might serve as a reservoir for resistance genes or that it can colonize the human intestinal tract (Bauchart *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012).

The emergence of plasmid-mediated antimicrobial resistance genes among bacteria can aid pathogenic bacteria in surviving host defenses. An important finding in the last several years is the increase of extended-spectrum β -lactamase(ESBL)-producing bacteria in chicken meat in some places. ESBL production confers broad-spectrum resistance and is a health risk given that ESBL genes are easily transferable between bacteria; therefore, there may be a transfer risk from food-producing animals to humans via poultry meat (Warren *et al.*, 2008; Dierikx *et al.*, 2012).

Paraná, located in the south of Brazil, is the largest producer of poultry meat in Brazil (UBABEF, 2013). However, there have been few studies examining the frequency of antimicrobial resistance and virulence factors in isolates from chicken carcasses in this region. In the present study, we analyzed the profile of antimicrobial resistance and virulence factors in strains of *E. coli* isolated from poultry carcasses in 2007 and 2013. Changes in resistance and virulence were verified, since the antimicrobials tested have been banned for use as growth promoters in aviculture in Brazil (Brasil, 2003; 2009).

Materials and Methods

Bacterial isolates

A total of 205 *E. coli* strains were isolated from commercial refrigerated chicken carcasses, intended only for local consumption, that were sold in the city of Londrina (northern region in Paraná, Brazil). Of the 205 strains, 84 *E. coli* strains were isolated in 2007 from 40 poultry carcasses (Kobayashi *et al.*, 2011), and 121 *E. coli* strains were isolated in 2013 from 26 poultry carcasses. Six main chicken brands consumed in the region were analyzed in the corresponding periods. Each chicken carcass was placed in sterile packaging with 100 mL of brain-heart infusion broth (Himedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, India). After homogenization, 0.1 mL was smeared on MacConkey agar (Neogen Corporation, Lansing, Michigan) and into crystal violet neutral red bile agar (Neogen Corporation, Lansing, Michigan) in poured plates, and the plates were incubated at 37°C for 18-24h. Suspected colonies were confirmed to be *E. coli* via biochemical tests such as EPM, MILi (Toledo *et al.*, 1982a; 1982b) and Simon's citrate agar (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). One to eight strains were collected from each chicken carcass. Only strains that exhibited different genotypic characteristics of virulence factors and phenotypic resistance were selected.

Phylogenetic Classification

E. coli strains were assigned to one of four phylogenetic groups (A, B1, B2 or D). Phylogenetic classification was based on the analysis of the presence of the *chuA* and *yjaA* genes and a DNA fragment (TSPE4.C2), as described by Clermont and colleagues (2000). This PCR reaction contained 1.25 U Taq DNA polymerase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) in 1X PCR buffer (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA), 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, and 1 μ M of each primer. The PCR program consisted of 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension step at 72°C for 7 min (Clermont *et al.*, 2000). PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained

with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using an Image Capture system (LPixImageHE).

Virulence Factor Genes

Five genes encoding virulence factors in ExPEC were investigated. The selected genes were *iutA* (aerobactin siderophore receptor gene), *hlyF* (putative avian hemolysin), *iss* (episomal increased serum survival gene), *iroN* (salmochelin siderophore receptor gene), and *ompT* (episomal outer membrane protease gene). The PCR reaction contained 1.25U Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) in 1X PCR buffer (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 0.2mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂, and 1μM of each primer. The PCR program consisted of 94°C for 2 min, followed by 25 cycles of 94°C for 30s, 63°C for 30s, and 68°C for 3 min, and a final extension step at 72°C for 10 min (Johnson *et al.*, 2008). PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using an Image Capture system (LPixImageHE).

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing of *E. coli* isolates was performed using the standard disk diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008; 2013). Antimicrobials used included the following: 5μg of ciprofloxacin; 10μg each of ampicillin, gentamicin, norfloxacin and enrofloxacin; 30μg each of cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, nalidixic acid and chloramphenicol; 300μg of nitrofurantoin; 1.25/23.75μg of trimethoprim-sulfamethoxazole; and 20/10μg of amoxicillin-clavulanic acid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK). Strains resistant to third-generation cephalosporins were tested in an ESBL test. ESBL production was confirmed via double-disk diffusion testing for amoxicillin/clavulanate and cefotaxime or ceftazidime, or by using a combination disk test with cefotaxime, cefotaxime+clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD), ceftazidime and ceftazidime+clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD), according to CLSI recommendations. The *E. coli* isolate ATCC 25922 was used as a negative control and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 as positive control. ESBL-producing *E. coli* were characterized in terms of ESBL gene groups (1, 2, 8, 9 and 25 groups) by PCR as described by Woodford and colleagues (2006).

Statistical analysis

All frequencies comparisons among different groups was performed with Fisher's exact test and the Chi-square test. Findings were considered significant for $p < 0.05$. The tests were performed with the statistical program R version 3.1.0.

Results

Virulence factors and phylogenetic classification

In both 2007 and 2013, the *iutA* gene was the most prevalent and was present in 66.6% and 54.5% of isolates, respectively. We noted few changes in the frequencies of the *hlyF*, *iutA*, *ompT* and *iroN* genes when comparing both years analyzed. However, the *iss* gene was significantly different ($p < 0.05$) (Table 1). We found that among the strains isolated in 2013, 19.8% were positive for all five genes surveyed versus 8.3% in 2007 ($p < 0.05$ using Chi-square test).

In terms of phylogenetic classification, the most prevalent group in 2007 was group D (34.5%), whereas in 2013, the most prevalent group was group B1 (37.2%). All four

phylogenetic groups were found in both years. We also noticed that there was a reduction in the percentage of strains in groups B2 and D; 50% of strains were B2 or D in 2007, whereas in 2013, only 33.8% were B2 or D ($p < 0.05$). We also noted that group B1 greatly increased ($p < 0.05$) (**Table 1**).

Resistance

In 2007, we found a high frequency of resistance to tetracycline (70.24%), nalidixic acid (61.9%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (58.33%) (**Figure 1**). In addition, 62 (73.8%) of the strains were resistant to three or more antimicrobials (**Table 2**).

In 2013, we found an increase in the frequency of resistance to the majority of antimicrobials tested, with the exception of gentamicin, ciprofloxacin, enrofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole (**Figure 1**). Resistance to tetracycline was most frequently observed in 2013 as well, with 90.91% of strains, followed by nalidixic acid (78.51%) and ampicillin (66.94%) (**Figure 1**). We observed that 79.3% of strains were resistant to 3 or more antimicrobials (**Table 2**), and all strains were resistant to at least one antimicrobial tested.

An interesting observation was that 39 strains present in 17 chicken carcasses (65.4% of carcasses analyzed in 2013) were positive in the ESBL test in 2013 for all brands except one; we did not observe these results in 2007. Alleles encoding group 2 cefotaximase (CTX-M) enzymes were the most commonly found (64.1%). Among the strains that produced ESBL, the majority were associated with non β -lactam antibiotics, primarily tetracycline (97.4%) and nalidixic acid (79.5%) (**Table 3**).

Discussion

Currently, chicken meat is one of the most consumed meats in the world, and Brazil is the world's largest exporter of chicken meat and the third largest producer (UBABEF, 2013). Recently, many authors have demonstrated that *E. coli* from poultry is the food animal source most closely linked to human ExPEC, suggesting zoonotic risk (Marshall and Levy, 2011; Manges and Johnson, 2012; Mellata, 2013).

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) is responsible for avian colibacillosis, which promotes significant economic losses in the poultry industry worldwide (Kobayashi *et al.*, 2011). Johnson and colleagues (2008) showed that APEC isolates can be distinguished from avian fecal *E. coli* isolates by their possession of five genes carried by plasmids (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* and *ompT*). Our results show that these genes are present in *E. coli* isolates from chicken carcasses.

The most prevalent virulence gene was *iutA* in both years surveyed; this gene encodes a siderophore system that is highly prevalent in ExPEC isolates (Bélanger *et al.*, 2011). In 2013, 19.8% of the strains were positive for all five genes surveyed, versus 8.3% in 2007. These virulence genes are generally present on typical APEC plasmids in a conserved virulence plasmidic (CVP) region (Lemaître *et al.*, 2013), and the presence of the five genes in our strains indicated that they may carry this region, but we can not confirm this because plasmids were not examined by our group.

These genes were also found in human *E. coli* isolates, such as those isolated from urinary tract infections and sepsis (Luo *et al.*, 2012; Koga *et al.*, 2014). Koga and colleagues (2014) showed that 3 of 14 strains that possessed plasmids had conjugative plasmids, and some of these carried the *iss*, *iroN*, *ompT* and *hlyF* genes, which are the genes that were identified in our strains isolated from chicken carcasses. This indicates that *E. coli* strains isolated from commercial chicken carcasses have potential zoonotic risks and additionally serve as reservoirs for virulence genes for ExPEC strains.

Studies have demonstrated that the majority of ExPEC strains belong to phylogenetic group B2 (Clermont *et al.*, 2000). The most prevalent phylogenetic group in our results was group D in 2007 and group B1 in 2013. Group B2 was infrequently found, and its frequency decreased from 2007 to 2013 (15.48% to 4.13%, $p < 0.05$). The low presence of group B2 among strains indicates that the main contamination of chicken carcasses occurs with commensal bacteria.

The use of antimicrobial agents to increase poultry production can be linked to the emergence of drug-resistant bacteria, including antimicrobials for human use (Marshall and Levy, 2011). In the present study, we analyzed the frequency of antimicrobial resistance for strains isolated in 2007 and 2013. Despite the fact that many antimicrobials, such as tetracyclines, β -lactams and quinolones, are prohibited as growth promoters in Brazil (BRASIL, 2003; 2009), the frequency of antimicrobial resistance among our strains isolated in 2013 was higher than the strains isolated in 2007 for the majority of the antimicrobials tested.

Resistance to tetracycline was most frequently observed in strains from both 2007 and 2013, and there was a significant increase ($p < 0.05$) over the six years gap. Rossa and colleagues (2013) demonstrated high resistance to tetracycline in Brazil in enterobacteria from conventional poultry, including *E. coli*. Similar data were also provided for other countries (Kang *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2012). This antimicrobial was one of the first to be used as a growth promoter in the 1940s and was widely used until recently. The high frequency of resistance to tetracycline may be related to the ease of access to and the low price of this antimicrobial in veterinary medicine in Brazil (Phillips *et al.*, 2004).

Quinolones are broad-spectrum agents that are often used for enteric infections and human urinary tract therapy (Pitout, 2012). However, the presence of quinolone-resistant *E. coli* in animals has increased (Lai *et al.*, 2013). Our results indicate a high frequency of resistance to nalidixic acid in strains isolated from chickens, with an increase from 61.9% in 2007 to 78.5% in 2013 ($p < 0.05$). This can indicate that there has been an increase in the use of quinolones in poultry.

β -lactams are among the most clinically relevant antibiotics, particularly against pathogenic Gram-negative bacteria, and β -lactam resistance has frequently been linked to bacteria associated with food-producing animals (Dierikx *et al.*, 2012; Pitout, 2012). One of the mechanisms of resistance to β -lactams is the production of ESBL enzyme. The emergence and dissemination of ESBL-producing bacteria among Enterobacteriaceae has been reported as a major public health issue, mainly in nosocomial infections. However, ESBL-producing bacteria from outpatient and environmental samples have been identified as well (Dierikx *et al.*, 2012; Korzeniewska and Harnisz, 2013). In 2007, our strains did not exhibit ESBL, but interestingly, 39 strains positive for ESBL production, isolated from 17 chicken carcasses, were found in 2013, and group 2 CTX-M enzymes were the most prevalent (64.1%). In 2009, the production of CTX-M2 by *Salmonella enteric* in chickens in southern Brazil was reported (Fernandes *et al.*, 2009). Other countries have also reported a high prevalence of ESBL-producing bacteria isolated from birds (Dierikx *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2012; Reich *et al.*, 2013). Our results suggest that broad-spectrum cephalosporins may be used in aviculture. In Canada, the emergence of ESBL genes in poultry carcasses was associated with the use of third-generation cephalosporins, particularly ceftiofur, in aviculture; these drugs are injected into eggs to control *E. coli* omphalitis in broiler chickens (Dutilet *et al.*, 2010; Mellata, 2013).

Our results demonstrated that, in 2013, 79.3% of strains were resistant to 3 or more antimicrobials. ESBL-producing *E. coli* strains can harbor genes for resistance to other families of antimicrobials such as fluoroquinolones, aminoglycosides, and sulfonamides, among others. This can occur because the genes that encode for resistance for both *bla*_{ESBL} and other antimicrobial classes are often located in the same mobile genetic elements, such as

plasmids or transposons (Cantón and Coque, 2006). In our study, the majority of ESBL-producing strains were associated with resistance to non- β -lactam antibiotics, primarily tetracycline (97.4%) and nalidixic acid (79.5%). Another possibility for the presence of ESBL-producing bacteria in poultry is co-selection via the use of other antimicrobials.

In our study, there was a high frequency of resistance to antimicrobials, despite the banning of several groups of antibiotics as growth promoters in poultry in Brazil. This suggests that the long-term use of antimicrobials in aviculture has caused selection pressure among bacteria.

Considering the importance of chicken meat exportation to Brazilian agribusiness, monitoring the frequency of antimicrobial resistance in animal products can assuring quality for the consumption of chicken meat. These findings led us to believe that the presence of isolates harboring virulence and resistance genes in chicken carcasses and the use of antimicrobials in food animal production can facilitate the transmission of these bacteria between different hosts, suggesting a zoonotic risk.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Chamada MCTI/CNPq/ANVISA nº23/2012). Thanks are also given to CAPES for the use of financial facilities.

References

- 1- Asai T, Hiki M, Ozawa M, Koike R, Eguchi K, Kawanishi M, Kojima A, Endoh YS, Hamamoto S, Sakai M, Sekiya T. Control of the development and prevalence of antimicrobial resistance in bacteria of food animal origin in Japan: a new approach for risk management of antimicrobial veterinary medicinal products in Japan. *Foodborne Pathog Dis* 2014; 11: 171 – 176.
- 2- Bauchart P, Germon P, Brée A, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microb Pathog* 2010; 49: 105 – 115.
- 3- Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 62: 1 – 10.
- 4- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. 2003. Available at: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20-%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos, accessed January 30, 2014. (In Portuguese)
- 5- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a

comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. 2009. Available at:

<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>, accessed January 30, 2014. (In Portuguese)

6- Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 466 – 475.

7- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4555 – 4558.

8- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23th Informational Supplement*. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA: CLSI, 2013.

9- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, 3rd ed. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA: CLSI, 2008.

10- Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother* 2012; 68: 60 – 67.

11- Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, Pillai DR. Ceftiofur resistance in *Salmonella enteric* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 48 – 54.

12- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 646 – 655.

13- Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues ÂC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microbiol Drug Resistance* 2009; 15: 317 – 321.

14- Hasan B, Sandegren L, Melhus A, Drobni M, Hernandez J, Waldenstrom J, Alam M, Olsen B. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 2055 – 2058.

15- Jiang HX, Lu DH, Chen ZL, Wang XM, Chen JR, Liu YH, Liao XP, Liu JH, Zeng ZL. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet J* 2011; 187: 99 – 103.

16- Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, DeRoy C, Wannemuehler YM, Obata-Yasuoka M, Spanjaard L, Nolan LK. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 37 – 46.

- 17- Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3987 – 3996.
- 18- Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 639 – 644.
- 19- Kobayashi RKT, Aquino I, Ferreira ALS, Vidotto MC. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in Southern Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 631 – 634.
- 20- Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G, Kobayashi RKT. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1 – 9.
- 21- Korzeniewska E, Harnisz M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *J Environ Manage* 2013; 15: 904 - 911.
- 22- Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Wang Y, Wang H, Liu Y, Shen J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *Int J Food Microbiol* 2014; 128: 904 – 911.
- 23- Lemaître C, Mahjoub-Messai F, Dupont D, Caro V, Diancourt L, Bingen E, Bidet P, Bonacorsi S. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. *PLoS One* 2013; 8: 1 – 10.
- 24- Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L, Zhang Y, Yang J. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 4002 – 4007.
- 25- Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 712 – 719.
- 26- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol* 2011; 24: 718 – 733.
- 27- Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis* 2013; 10: 916 – 932.
- 28- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 28 – 52.

- 29- Pitout JDD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol* 2012; 3: 1 – 7.
- 30- Reich F, Atanassova V, Klein G. Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1253 – 1259.
- 31- Rossa LS, Stahlke EVR, Diez DC, Weber SH, Stertz SC, Macedo REF. Resistência antimicrobiana e ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo. *Biotemas* 2013; 26: 211 – 220. (In Portuguese)
- 32- Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev Microbiol* 1982a; 13: 230 – 235. (In Portuguese)
- 33- Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. EPM-Modificação do meio Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás e partir de glicose, H₂S, uréase e triptofano desaminase. *Rev Microbiol* 1982b; 13: 309 – 315. (In Portuguese)
- 34- [UBABEF] União Brasileira de Avicultura – Brazilian Poultry Association. Relatório Anual 2013 – Annual Report 2013. Available at: www.ubabef.com.br, accessed January 30, 2014(In Portuguese).
- 35- Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, Harvey M, Livermore DM, Woodford N, Hawkey PM. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 504 – 508.
- 36- Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 154 – 155.

Table 1 – Prevalence of phylogenetic groups and virulence factors among strains of *E. coli* isolated from poultry carcasses in 2007 and 2013

	2007 (n=84)	2013 (n=121)
	No. of isolates (%)	No. of isolates (%)
Phylogenetic groups		
A	26 (30.9)	35 (28.9)
B1	16 (19.0)	45 (37.2)*
B2	13 (15.5)*	5 (4.1)
D	29 (34.5)	36 (29.7)
Virulence factors		
<i>hlyF</i>	34 (40.4)	57 (47.1)
<i>iutA</i>	56 (66.6)	66 (54.5)
<i>iss</i>	18 (21.4)	43 (35.5)*
<i>ompT</i>	39 (46.4)	64 (52.8)
<i>iroN</i>	28 (33.3)	35 (28.9)

* $p < 0.05$ –Chi-square test. 2007 vs. 2013 *E. coli* isolates

Table 2 –Prevalence of antimicrobial resistance among *E. coli* strains isolated from poultry carcasses in 2007 and 2013

Prevalence of antimicrobial resistance	2007	2013
	No. strains (%)	No. strains (%)
No resistance detected	4 (4.8)	0 (0)
Resistant to 1 or 2 antimicrobials	18 (21.4)	25 (20.7)
Resistant to 3 or 4 antimicrobials	32 (38.1)	23 (19)
Resistant to 5 or 6 antimicrobials	18 (21.4)	24 (19.8)
Resistant to 7 or 8 antimicrobials	10 (11.9)	32 (26.5)
Resistant to 9 or 10 antimicrobials	0 (0)	11 (9.1)
Resistant to 11 or 12 antimicrobials	2 (2.4)	6 (4.9)

Table 3 – Phylogenetic classifications, virulence factors and antimicrobial resistance profiles of ESBL-producing strains isolated in 2013

Strains N= 39	Phylogenetic classifications	Virulence factors	Group	CTX-M enzymes	Resistance profiles
2.1	A	<i>hlyF, ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet
2.2	A	<i>ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet
2.3	B1	<i>hlyF, ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, nit
2.4	B1	<i>ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet
2.5 T	B1	<i>ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, caz, tet
2.6 T	B1	<i>hlyF, ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, enr
2.8 A	A	<i>ompT</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, nit
21.7	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	NF		Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr
22.4	D	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, nor, enr, sut
22.6	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group1	CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, tet, nal
22.1 EC	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group 1	CTX-M;	Amp, amc, kz, ctx, caz, clo, tet, nal, cip, nor, enr, sut
22.2 EC	B1	NF	Group 2	CTX-M;	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr, sut
22.2 A	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group 8	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, enr
22 TE	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, enr
23.5	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group 2	CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, nor, enr, sut
28 TE	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group8	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr
29.3	A	<i>iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, sut
29.5	D	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor enr, sut
29 C	D	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr, sut
30.1	D	<i>iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal
30.2	A	<i>iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, sut
30.6	A	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal
30.7	D	<i>iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal
32.3 A	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, enr
33.4	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, sut
34.2 TE	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2	CTX-M	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal

35.1	D	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, kz, ,ctx, cn, tet, nal,cip, enr, sut
35 A	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2CTX- MGroup 8 CTX- M	Amp, amc, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, enr, sut
35 C	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group 8 CTX-M	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, enr
35 TE	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal
36.3	B2	<i>hlyF, ompT,iss, iroN, iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, kz, ctx, clo, cn, nal, sut
37 A	A	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal
41.2	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group8 CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, tet, nal
41 A	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group8 CTX-M	Amp, amc, kz, tetnal
42.2	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	Group8 CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, clo, tet, nit, nal, cip, nor, enr, sut
43.1	D	<i>iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet
43 A	A	<i>iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, tet, nit, nal
44.1	A	<i>iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, amc, kz, cn, tet, nal, sut
44.4	D	<i>iutA</i>	Group2 CTX-M	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet, nal

Abbreviations: ampicillin (AMP); amoxicilli-clavulanic acid (AMC); cefazolin (KZ); ceftazidime (CAZ); cefotaxime (CTX); chloramphenicol (CLO); gentamicin (CN); tetracycline (TET); nitrofurantoin (NIT); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); enrofloxacin (ENR); trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT). Not found (NF).

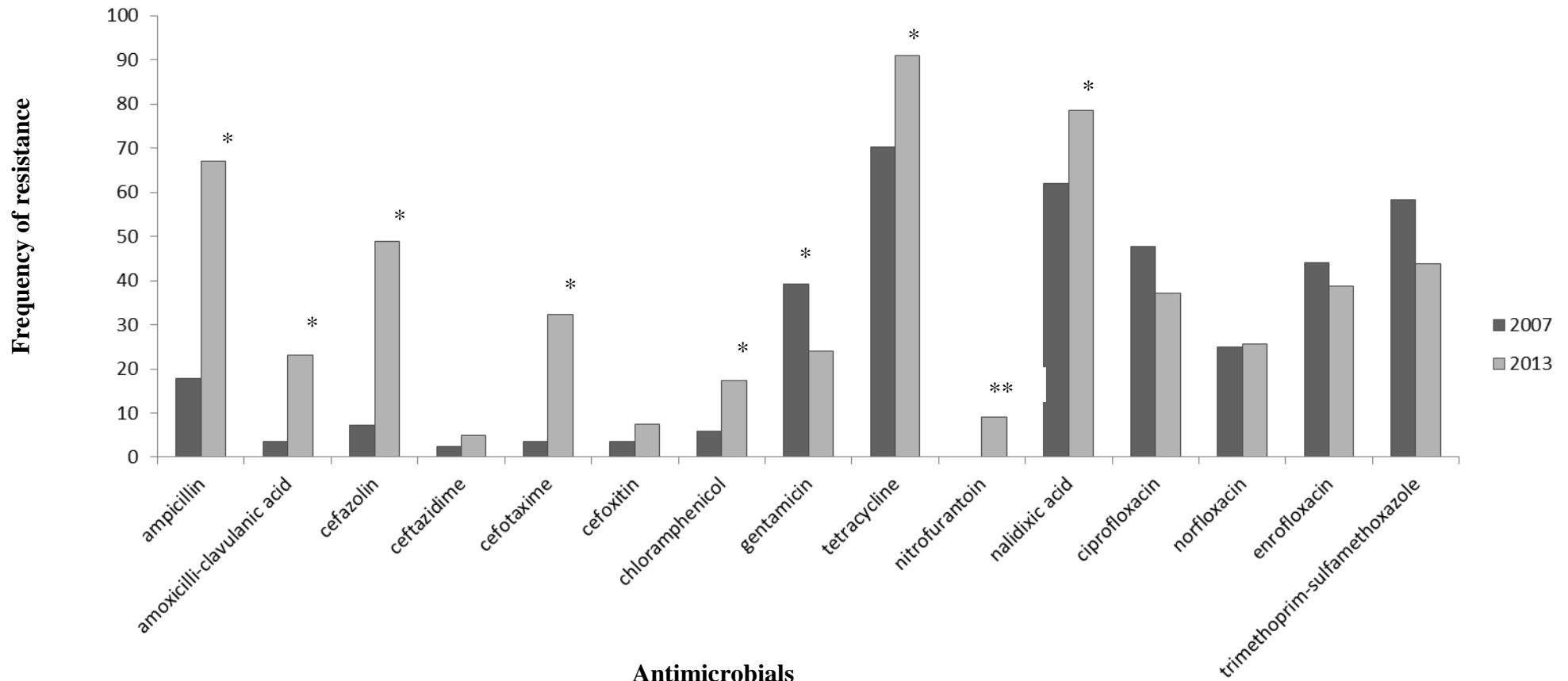


Figure 1 – Frequencies of resistance exhibited by *E. coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013

* $p < 0.05$ - Chi-square test

** $p < 0.05$ – Fisher exact test

1 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 2

2

3 Enviado para a revista “Journal of Food Protection” em 22 de dezembro de 2014.

4

5 **Running title**

6 *E. coli* from conventional and free-range poultry

7

8 **Evaluation of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated**
9 **from conventional and free-range poultry**

10

11 Vanessa L. Koga¹, Sara Scandorieiro¹, Eliana C. Vespero², Alexandre Oba³, Benito G. de
12 Brito⁴, Kelly C. T. de Brito⁴, Gerson Nakazato¹, Renata K. T. Kobayashi^{1*}

13

14 ¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

15 ² Departamento de Patologia e Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de
16 Londrina, Paraná, Brasil

17 ³ Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

18 ⁴ Laboratório de Saúde das Aves, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
19 (IPVDF) – Fepagro Saúde Animal, Rio Grande do Sul, Brasil

20

21

22 *Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia - CCB. Campus
23 Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Caixa Postal 6001, 86051-980, Londrina, Paraná,
24 Brazil. Tel. 55(43)33714396, Fax number. 55(43)33714788.

25 **Email: kobayashirkt@uel.br**

26

27 **Abstract**

28

29 Microbiological contamination in commercial poultry production has caused concerns
30 for human health both because of the presence of pathogenic microorganisms and the increase
31 in antimicrobial resistance in bacterial strains that can cause treatment failure of human
32 infections. *Escherichia coli* has been widely used as a bioindicator of resistance to
33 antimicrobials and pathogens to birds. The aim of our study was to verify the differences in the
34 antimicrobial resistance and pathogenicity profiles of *E. coli* isolates from chicken carcasses
35 obtained from different farming systems (conventional and free-range poultry). A total of 156
36 *E. coli* strains were isolated and characterized for genes encoding virulence factors usually
37 described in extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (*hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN* and *iutA*) and
38 phylogenetic classification by polymerase chain reaction. Antimicrobial susceptibility
39 testing was performed for 15 antimicrobials. Strains that were suspected of extended-spectrum
40 of β -lactamases (ESBL)/ AmpC-producing *E. coli* in a phenotypic test were confirmed by
41 genotypic test. The results indicated that strains from free-range poultry have fewer virulence
42 factors than strains from conventional poultry. In the phylogenetic classification, strains from
43 free-range poultry mostly belonged to group A, whereas strains from conventionally raised
44 chickens belonged to group B1. Strains from conventionally raised chickens had a higher
45 frequency of antimicrobial resistance for all antibiotics tested and also exhibited genes
46 encoding ESBL/AmpC, unlike free-range poultry isolates, which did not. Group 2 CTX-M
47 and CIT were the most prevalent ESBL/ AmpC genes, respectively. The absent or restricted
48 use of antimicrobials in free-range poultry production may contribute to the lower frequency
49 of virulence factors and resistance to antimicrobials in bacteria, leading to a lower risk of their
50 transmission to humans.

51 **Keywords:** Poultry, *Escherichia coli*, ESBL, AmpC, Virulence factors

52 Introduction

53

54 Antimicrobial resistance has become a major concern for both human health and in
55 veterinary medicine. Antimicrobial agents are being used in many countries in veterinary
56 practice for therapy and prophylaxis of infectious diseases and for growth promotion in food
57 animals. However, the indiscriminate use of antimicrobials can result in bacterial selection
58 pressure of the intestinal microbiota of animals (20, 26,27). Because multi-resistant bacteria
59 are frequently found in poultry meat (10, 14,18), chicken products are suspected to be a
60 source of foodborne pathogen and/or antimicrobial resistance bacteria for humans(2, 5,20, 26,
61 27).

62 *Escherichia coli* have an important role within resistant bacteria populations, being
63 widely used as a bioindicator of antimicrobial resistance and pathogenic to humans and
64 animals. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) can cause many human
65 infections, such as septicemia, meningitis and urinary tract infections, also cause disease in
66 birds, being responsible for significant economic losses in poultry industry (20, 32). ExPECs
67 are characterized by the possession of many virulence factors including adhesins, toxins, iron
68 acquisition systems, and serum resistance factors, and belong mainly to group B2 and
69 occasionally to group D, whereas commensal *E. coli* belong to groups B1 and A (11, 21).

70 β -lactamase production is the most common mechanism for β -lactam in Gram-
71 negative bacteria and are increasing in occurrence in humans, becoming a major public health
72 problem (32). However, β -lactamases of community and environmental origin have been
73 discovered, including in food animals. Poultry are recognized as important carriers of β -
74 lactamase-producing *E. coli*, and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)/AmpC-producing
75 bacteria in birds have been reported in many countries (7, 15, 37).

76 ESBL-production confers resistance to 3rd- and 4th-generation cephalosporins but not
77 to cephamycins (cefoxitin) and carbapenems and are inactivated by clavulanic acid. The
78 AmpC enzymes confer resistance to 3rd generation cephalosporins and cephamycins but are
79 not inhibited by β -lactamase inhibitors. Plasmid-mediated β -lactamases can carry multiple
80 resistance genes non- β -lactam, and their indiscriminate use can lead to co-selection and/or co-
81 resistance in bacteria populations (23).

82 Many studies reported that there is a genetic similarity among avian and human
83 ExPEC, leading to the hypothesis that meat animals play a role as reservoirs for drug-resistant
84 bacteria and pathogenic bacteria (3, 20).

85 Little is known regarding the microbiological quality of chicken meat from different
86 systems of poultry farming and their potential antimicrobial resistance and/or pathogenic
87 behavior up on consumption. The aim of this study was to analyze the profile of virulence
88 factors and antimicrobial resistance, including searching for ESBL/AmpC groups genes, in
89 strains of *E. coli* isolated from conventional and free-range poultry carcass.

90

91 **Material and Methods**

92

93 **Bacterial isolates.** A total of 156 *E. coli* strains were isolated from commercial refrigerated
94 chicken carcass, intended only for local consumption, sold in the city of Londrina (north
95 region in Paraná, Brazil). Of these, 35 *E. coli* strains were isolated from 15 free-range poultry
96 (commonly created by family agriculture), and 121 *E. coli* strains from 26 conventionally
97 raised poultry (sold in markets in the region, obtained from granges). Each chicken carcass
98 was placed into the sterile packaging with 100 mL of Brain Heart Infusion (Himedia
99 Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, India). After homogenization, 0.1mL was smeared onto
100 MacConkey agar (Neogen Corporation Lansing, Michigan) and crystal violet red neutron bile

101 agar (Neogen Corporation Lansing, Michigan) by pour plate. Both were incubated at 37°C for
102 18-24h. Colonies suspected to be *E. coli* were confirmed by biochemical tests such as EPM,
103 MILi (35, 36) and Simons citrate agar (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). One-to-eight
104 strains were collected from each chicken carcass. Only strains that showed different genotypic
105 characteristics of virulence factors and phenotypic resistance were selected.

106

107 **Phylogenetic Classification.** *E. coli* strains were assigned to phylogenetic groups (A, B1, B2
108 or D), according to the method of Clermont and collaborators (2000). This method is based on
109 analyze of presence of the *chuA* and *yjaA* genes and the DNA fragment (TSPE4.C2), as
110 determined by Polymerase Chain Reaction (PCR). This PCR reaction contained 1.25U Taq
111 DNA polymerase (Life technologies, Rockville, Md.) in 1X PCR buffer (Life technologies,
112 Rockville, Md.), 0.2 mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂, and 1μM of each primer. The
113 conditions of PCR consisted of 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C
114 for 30 s, 72°C for 30s with a final extension step at 72°C for 7 min. PCR amplicons were
115 visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After
116 gel electrophoresis the images were captured using Image Capture Systems (LPixImageHE).

117

118 **Virulence Factor Genes.** Several virulence factors normally studied in ExPEC strains were
119 surveyed. The selected genes were as follows: *iutA* (aerobactin siderophore receptor gene),
120 *hlyF* (putative avian hemolysin), *iss* (episomal increased serum survival gene), *iroN*
121 (salmochelin siderophore receptor gene), and *ompT* (episomal outer membrane protease
122 gene). This PCR contained 1.25U Taq DNA polymerase (Life technologies, Rockville, Md.)
123 in 1 X PCR buffer (Life technologies, Rockville, Md.), 0.2mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂,
124 and 1μM of each primer. The conditions of PCR consisted of 94°C for 2 min, followed by 25
125 cycles of 94°C for 30s, 63°C for 30s, and 68°C for 3 min, with a final extension step at 72°C

126 for 10 min (21). PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed
127 (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using
128 Image Capture Systems (LPixImageHE).

129

130 **Antimicrobial Susceptibility Testing.** Antimicrobial susceptibility was performed using the
131 standard disk diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards
132 Institute (12, 13). Antimicrobials used included: 5 μ g of ciprofloxacin; 10 μ g each of
133 ampicillin, gentamicin, norfloxacin and enrofloxacin; 30 each μ g of cefazolin, cefotaxime,
134 ceftazidime, tetracycline, nalidixic acid and chloramphenicol; 300 μ g of
135 nitrofurantoin; 1.25/23.75 μ g of trimethoprim-sulfamethoxazole; 20/10 μ g of amoxicillin-
136 clavulanic acid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK). Strains resistant to third-generation
137 cephalosporines were confirmed for ESBL production by double-disk diffusion testing
138 between amoxicillin/clavulanate and cefotaxime or ceftazidime (17), or by using a
139 combination disc test including cefotaxime, cefotaxime+clavulanic acid (Becton Dickinson,
140 Sparks, MD), ceftazidime and ceftazidime+clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD),
141 according to the CLSI recommendations. The strains positive in the phenotypic tests to ESBL
142 production were screened to ESBL genes. Strains that showed intermediate or resistance to
143 ceftazidime and/or to 3rd-generation cephalosporins were tested by molecular screening of
144 AmpC types genes. The *E. coli* isolate ATCC 25922 was used as a quality control to
145 antimicrobial susceptibility testing, and the results were interpreted as per CLSI criteria.

146

147 **Characterization of β -Lactamase Genes of ESBL and AmpC groups.** ESBL-producing *E.*
148 *coli* was characterized for ESBL genes encoding CTX-M (1, 2, 8, 9 and 25 groups), TEM and
149 SHV type by PCR (1, 4, 38). All isolates suspected by phenotypic tests for the production of
150 AmpC were tested by a multiplex PCR described by Pérez-Pérez and Hanson (2002). Six

151 family-specific AmpC genes plasmid mediated (MOX, FOX, EBC, ACC, DHA and CIT)
152 were evaluated. PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed
153 (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using
154 Image Capture Systems (LPixImageHE).

155

156 **Statistical Analysis.** Comparisons of frequencies among different groups were made by the
157 Fisher's Exact test and Chi-square test. Findings were considered to be significant where P
158 <0.05 . The test was performed with the statistical program R version 3.1.0.

159

160

161 **Results**

162

163 According to phylogenetic classification, the most prevalent group in strains from
164 free-range poultry was the group A (54.3%), whereas the strains from conventionally raised
165 poultry most frequently belonged to group B1 (37.2%), although no statistically significant
166 differences were observed between them and groups B1, B2 and D (**Table 1**).

167 Regarding the search to virulence factors, we found significant difference for the
168 majority of the genes studied between strains from free-range and conventional poultry, with
169 the exception of the *iss* gene ($p>0.05$) (**Table 1**). Few strains from free-range poultry were
170 positive for virulence factors, with only 10 strains (28.6%) having at least one of virulence
171 factors studied. In contrast, 91 strains (75.2%) from conventionally raised poultry had at least
172 one virulence factor.

173 According to the antimicrobial susceptibility test, strains from conventionally raised
174 poultry showed a higher frequency of antimicrobial resistance than strains from free-range
175 poultry for all antimicrobials tested (**Figure 1**). The frequency of antimicrobial resistance to

176 strains from free-range poultry were low, except to tetracycline (60% of resistance), whereas
177 the strains from conventional poultry showed a high frequency of resistance mainly to
178 tetracycline, nalidixic acid and ampicillin.

179 ESBL/AmpC genes appeared only in strains isolated from conventional poultry
180 (42.1% of 121 strains from conventional poultry). Forty strains were ESBL-producing *E. coli*.
181 The most prevalent group within these ESBL was the group 2 CTX-M (62.5% of ESBL-
182 producing strains). Eleven strains showed only the CIT group of AmpC genes (9.1% of 121
183 strains from conventional poultry). No strain had ESBL and AmpC genes together (**Table 2**).

184 All ESBL/AmpC-producing strains showed resistance to one or more non- β -lactam
185 antimicrobials, with resistance to tetracycline (98%) the most prevalent (**Table 2**).

186 We observed that ESBL/AmpC-producing strains were present in all four phylogenetic
187 groups (A, B1, D and B2), although there were few B2 strains. The majority of these strains
188 were positive for at least one virulence factor.

189

190

191 **Discussion**

192

193 Many studies have demonstrated similarities between human and avian ExPEC,
194 leading to the hypothesis that poultry products may serve as a source of ExPEC and are
195 closely linked to human infections. Poultry meat exhibits the highest levels of *E. coli*
196 contamination, and these are indicated as being more extensively antimicrobial-resistant than
197 *E. coli* from other meats (25).

198 Avian *E. coli* often possess virulence genes similar to those found in human ExPEC
199 (25). We measured 5 virulence genes carried by plasmids that are normally studied in human
200 ExPEC (22, 24) and used by Johnson and collaborates (2008) to distinguished avian

201 pathogenic avian *E. coli* (APEC) from commensal *E. coli*. Our results demonstrated that
202 strains from conventionally raised poultry have a greater number of virulence genes than the
203 strains from free-range poultry, with the exception of the *iss* gene ($p>0.05$). Furthermore, few
204 strains from free-range poultry showed virulence factors, unlike strains from conventionally
205 raised poultry, of which 75.2% had at least one virulence factor. According to phylogenetic
206 classification, our results showed most prevalence of group A in strains from free-range
207 poultry and group B1 in strains from conventionally raised poultry. Thus, the majority of the
208 strains show characteristics relative to commensal phylogenetic groups, although most strains
209 from conventionally raised poultry were positive for virulence factors. These results can be
210 related to the creation system because the conventional poultries are raised in larger groups in
211 few areas, generating a high density, which facilitates the transmission of bacteria between
212 them because there are many virulence genes carried by plasmids, whereas free-range poultry
213 creation is in small groups, making it more difficult to transmit pathogens (15).

214 Antimicrobial resistance in bacteria isolated from food of animal origin is often
215 associated with the indiscriminate use of antibiotics in livestock (5, 26, 27). Due to the risks
216 that the use of antimicrobials in aviculture may present to humans, the use of several
217 antibiotics including tetracyclines, β -lactams, systemic sulfonamides, quinolones and others
218 has been banned as growth promoters in Brazil, (8, 9).

219 In the antimicrobial susceptibility test, strains isolated from conventionally raised
220 poultry showed a higher frequency of resistance than the strains from free-range poultry to all
221 antimicrobials. There were significant differences for the majority of the antimicrobials tested,
222 except for cefoxitin, ceftazidime and nitrofurantoin ($p>0.05$). The high frequency of
223 antimicrobial resistance in strains from conventional poultry carcasses, primarily to
224 tetracycline, nalidixic acid and ampicillin, can be related to the high use of antimicrobials in
225 aviculture industries.

226 However, an interesting finding in our study was the low frequency of antimicrobial
227 resistance in strains from free-range poultry, excepted to tetracycline. It is known that the use
228 of antimicrobials in family agriculture is restricted or even absent, being casually used for
229 treating diseases (28). Another hypothesis for the low observed frequency is that free-range
230 poultry normally live in small groups, compared to conventionally raised poultry, leading to
231 individual therapeutic interventions. Whereas in the poultry industry, birds are kept in larger
232 groups, so population-based therapeutics are mostly appropriate (15).

233 Tetracycline was the antimicrobial with the highest frequency of resistance in both
234 rearing systems. The high frequency may be due to the easy access to and low price of these
235 antimicrobial and difficult of monitoring by regulatory bodies in veterinary medicine in the
236 Brazil because these antimicrobials have prohibited use (9). Another explanation of the high
237 frequency of resistance in strains from free-range poultry is it contact with environmental
238 microorganisms, which produce natural antibiotics, or by soil contamination with the feces of
239 wild animals that carry antibiotic-resistant microorganisms (5, 34).

240 β -lactam antimicrobials, especially the third-generation cephalosporins, is the most
241 common treatment for human infections by Enterobacteriaceae. However, a large number of
242 resistant bacteria have emerged worldwide. Among ExPEC, β -lactamases remain the most
243 important mechanisms of β -lactam resistance. β -lactamases are hydrolytic enzymes that
244 cleave the β -lactam ring. The emergence of β -lactamases is mainly linked to the spread of
245 genes encoding ESBLs and/or plasmid-mediated AmpC β -lactamases (32). However,
246 ESBL/AmpC-producing bacteria are now being found in increasing numbers in food-
247 producing animals, including in poultry meat (14, 15, 33).

248 One notable finding, was the presence of ESBL/AmpC β -lactamases only in strains
249 from conventional poultry. The absence in strains from free-range poultry may indicate there
250 are use of antimicrobials in its production.

251 We determined that the most common β -lactamase-producing strains were for the
252 production of ESBL, with group 2 CTX-M the most prevalent (60.1% of ESBL-producing
253 strains). CTX-M-type strains are the most common ESBL type in humans, despite several
254 reports of TEM and SHV as well (32). Other countries have also reported a high prevalence of
255 ESBL-producing bacteria in poultry (14, 15, 33). In the Brazil, has been identified group 2
256 CTX-M in *Salmonella enteric* from chickens (16).

257 Plasmid-mediated AmpC genes are derived from chromosomal AmpC genes, being
258 the majority of plasmid-mediated AmpC genes found in nosocomial isolates of *E. coli* and
259 *Klebsiella pneumoniae*. Six families of plasmid-mediated AmpC β -lactamases have been
260 identified (30). Among AmpC, the CIT group was the most frequently observed in our results.
261 Studies have related the presence of the CIT group in poultry in others countries (7). In Brazil,
262 the presence of plasmid-mediated AmpC-producing in human isolates has been sporadically
263 reported (10, 29). Although there have previously been no studies reporting the presence of
264 AmpC in food animals, the presence of 11 AmpC-producing strains indicates the importance
265 of studies both in human and veterinary clinical practice.

266 Despite the increase of ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates in food-producing
267 animals, little is known about the use of β -lactam because these are banned as growth
268 promoters in Brazilian aviculture. One hypothesis is that theco-selection and co-resistance
269 have taken place because the gene encoding ESBL/AmpC and other classes non- β -lactam can
270 be located in the same mobile genetic element, such as plasmid or transposons (23).In our
271 study, ESBL/AmpC-producing strains showed resistance to one or more non- β -lactam
272 antibiotics, mainly to tetracycline (98% of the cases).

273 The presence of ESBL and AmpC gene was not observed in the same strain. It is
274 possible that there is a limit to the amount of β -lactamase that a bacterial cell can
275 accommodate and still be a viable pathogen (30).

276 We also note that the β -lactamases may be present in strains belonging to phylogenetic
277 groups from commensal groups A and B1, as well as virulent strains from group D. We note
278 also that the majority of ESBL/AmpC-producing strains have one or more virulence genes
279 tested. This can indicate that some strains harbor antimicrobial resistance genes mediated by
280 plasmids, perhaps are harboring virulence factors encoding genes mediated by other plasmid
281 too. Some studies have shown that virulence plasmids and multidrug resistance plasmid were
282 not found in the same strains (5, 6). However, Johnson and collaborators (2010) found in some
283 APEC strains hybrid resistance plasmids encoding both multiple resistance to antimicrobials
284 and virulence-associated genes that were able to infect human cells and cause meningitis in
285 rats.

286 The research of plasmid-mediated genes is important because their presence in food
287 may indicate a risk of the zoonotic transmission of β -lactamases-carrying bacteria and
288 plasmids (15).

289 The low frequency of antimicrobial resistance in strains from free-range poultry may
290 indicate that the low use of antimicrobials in this system rearing may be related to the low
291 frequency of resistance and virulence, which can lead to a low risk of transmission of
292 pathogens or resistance genes to humans through consumption of chicken meat. The
293 monitoring of antimicrobial resistance frequencies in animal foods can aid in the detection of
294 banned poultry farming practices.

295 In our results, it is clear that even with the prohibition of many antimicrobials, there is
296 still a high frequency of antimicrobial resistance in strains from conventional poultry. The
297 absence or restricted use of antimicrobials in free-range poultry production may be
298 contributing to the lower frequency of bacterial virulence factors and resistance to
299 antimicrobials, leading to a lower risk of their transmission to humans.

300

301 **Conflict of Interests**

302 The authors declare that they have no conflict of interests.

303

304 **Acknowledgments**

305 This study was supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e
306 Tecnológico (CNPq) (Chamada MCTI/CNPq/ANVISA nº23/2012). Thanks are also due to
307 CAPES for the use of financial facilities.

308

309 **References**

310

- 311 1. Arlet, G., and G. Philippon. 1991. Construction by polymerase chain reaction and use of
312 intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamase (TEM, SHV,
313 CARB) [corrected]. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 19 – 25.
- 314
- 315 2. Asai T., M. Hiki, M. Ozawa, R. Koike, K. Eguchi, M. Kawanishi, A. Kojima, Y. S. Endoh, S.
316 Hamamoto, M. Sakai, and T. Sekiya. 2014. Control of the development and prevalence of
317 antimicrobial resistance in bacteria of food animal origin in Japan: a new approach for risk
318 management of antimicrobial veterinary medicinal products in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.*
319 11: 171 – 176.
- 320
- 321 3. Bauchart P., P. Germon, A. Brée, E. Oswald, J. Hacker, and U. Dobrindt. 2010. Pathogenomic
322 comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – search for
323 factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microb. Pathog.* 49: 105 – 115.

324

- 325 4. Bedenić B., C. C. Randegger, E. Stobberingh, and H. Hächler. 2001. Molecular epidemiology
326 of extended-spectrum beta-lactamases from *Klebsiella pneumonia* strains isolated in Zagreb,
327 Croatia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*20: 505 – 508.
328
- 329 5. Bélanger L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau, and C. M. Dozois. 2011.
330 *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal
331 pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62: 1 – 10.
332
- 333 6. Bonnet C., F. Diarrassouba, R. Brousseau, L. Masson, E. Topp, and M. S. Diarra. 2009.
334 Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler
335 chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl. Environ. Microbiol.*75: 6955 –
336 6962.
337
- 338 7. Börjesson S., M. Egerväm, M. Lindblad, and S. Englynd. 2013. Frequent occurrence of
339 extended-spectrum beta-lactamase- and transferable AmpC beta-lactamase-producing
340 *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.*79: 2463 –
341 2466.
342
- 343 8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.27 de junho de 2003. Proíbe a
344 fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos
345 princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios
346 ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e
347 insetos: Instrução Normativa Nº9. Available at:
348 [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20-](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20-%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos)
349 [%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20-%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos), accessed January
350 30, 2014.(In Portuguese)
351

- 352 9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 9 de julho de 2009. Regulamento
353 técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos
354 antimicrobianos de uso veterinário: Instrução Normativa N°26. Available at:
355 <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizar>
356 [AtoPortalMapa&chave=1984822284](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizar), accessed January 30, 2014.(In Portuguese)
357
- 358 10. Campana E. H., P. P. Barbosa, L. C. C. Fehlberg, and A. C. Gales. 2013. Frequency of
359 plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. *Braz.*
360 *J. Microbiol.*44: 477 – 480.
361
- 362 11. Clermont O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the
363 *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4555 – 4558.
364
- 365 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for
366 antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals.
367 Approved standard, 3rd ed. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
368
- 369 13. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial
370 susceptibility testing;23rd informational supplement. CLSI Document M100-S23.
371 CLSI,Wayne, PA.
372
- 373 14. Dierikx C., J. van der Goot, T. Fabri, A. van Essen-Zandbergen, H. Smith, and D. Mevius.
374 2012. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in
375 Dutch broilers and broiler farmers. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 60 – 67.
376
- 377 15. Ewers C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L. H. Wieler. 2012. Extended-spectrum β -
378 lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion

- 379 animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol.*
380 *Infect.* 18: 646 – 655.
- 381
- 382 16. Fernandes S. A., D. L. Paterson, Â. C. Ghilardi-Rodrigues, J. M. Adams-Haduch, A. T.
383 Tavechio, and Y. Doi. 2009. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from
384 pediatric patients and poultry in Brazil. *Microbiol. Drug Resistance.* 15: 317 – 321.
- 385
- 386 17. Jacoby G. A., and P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical
387 isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 908 – 911.
- 388
- 389 18. Jiang H. X., D. H. Lu, Z. L. Chen, X. M. Wang, J. R. Chen, Y. H. Liu, X. P. Liao, J. H. Liu,
390 and Z. L. Zeng. 2011. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant
391 *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet. J.* 187: 99 – 103.
- 392
- 393 19. Johnson T.J., D. Jordan, S. Kariyawasam, A. L. Stell, N. P. Bell, Y. M. Wannemuehler, C. F.
394 Alarcón, G. Li, K. A. Tivendale, C. M. Loque, and L. K. Nolan. 2010. Sequence analysis and
395 characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling
396 zoonotic potentials for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 78: 1931 – 1942.
- 397
- 398 20. Johnson T. J., C. M. Logue, J. R. Johnson, M. A. Kuskowski, J. S. Sherwood, H. J. Barnes, C.
399 DebRoy, Y. M. Wannemuehler, M. Obata-Yasuoka, L. Spanjaard, and L. K. Nolan. 2012.
400 Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among
401 extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry.
402 *Foodborne Pathog. Dis.* 9: 37 – 46.
- 403

- 404 21. Johnson T. J., Y. Wannemuehler, C. Doetkott, S. J. Johnson, S. C. Rosenberger, and L. K.
405 Nolan. 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli*
406 (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3987 – 3996.
407
- 408 22. Koga V. L., G. Tomazetto, P. S. Cyoia, M. S. Neves, M. C. Vidotto, G. Nakazato, and R. K. T.
409 Kobayashi. 2014. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic
410 *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *Biomed. Res. Int.* 2014: 1 – 9.
411
- 412 23. Livermore D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect.*
413 *Dis.* 36: S11 – S23.
414
- 415 24. Luo Y., Y. Ma, Q. Zhao, L. Wang, L. Guo, L. Ye, Y. Zhang, and J. Yang. 2012. Similarity
416 and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of
417 *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from
418 reinfection. *J. Clin. Microbiol.* 50: 4002 – 4007.
419
- 420 25. Manges A. R., and J. R. Johnson. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing
421 extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55: 712 – 719.
422
- 423 26. Marshall B. M., and S. B. Levy. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human
424 health. *Clin. Microbiol.* 24: 718 – 733.
425
- 426 27. Mellata M. 2013. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections,
427 zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10: 916 – 932.
428

- 429 28. Obeng A. S., H. Rickard, O. Ndi, M. Sexton, and M. Barton. 2012. Antibiotic resistance,
430 phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of
431 intensively farmed and free range poultry. *Vet. Microbiol.*154: 305 – 315.
432
- 433 29. Pavez M., P. Neves, M. Dropa, M. H. Matté, R. S. Grinbaum, M. R. E. Araújo, E. M.
434 Mamizuka, and N. Lincopan. 2008. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli*
435 producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. *J. Med. Microbiol.*57: 1590 – 1592.
436
- 437 30. Pérez-Pérez F. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase
438 genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*40: 2153 – 2162.
439
- 440 31. Phillips I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston,
441 and J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health?
442 A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 28 – 52.
443
- 444 32. Pitout J. D. D. 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence
445 with antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3: 1 – 7.
446
- 447 33. Reich F., V. Atanassova, and G. Klein. 2013. Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-
448 producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 1253 –
449 1259.
450
- 451 34. Rossa L. S., E. V. R. Stahlke, D. C. Diez, S. H. Weber, S. C. Stertz, and R. E. F. Macedo.
452 2013. Resistência antimicrobiana e ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores
453 em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo. *Biotemas.* 26: 211 – 220. (In
454 Portuguese)
455

- 456 35. Toledo M. R. F., C. F. Fontes, and L. R. Trabulsi. 1982. Um meio para a realização dos testes
457 de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol.* 13: 230 – 235. (In Portuguese)
458
- 459 36. Toledo M. R. F., C. F. Fontes, and L. R. Trabulsi. 1982. EPM-Modificação do meio Rugai e
460 Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás e partir de glicose, H₂S,
461 uréase e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol.* 13: 309 – 315. (In Portuguese)
462
- 463 37. Warren R. E., V. M. Ensor, P. O'Neill, V. Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D. M.
464 Livermore, N. Woodford, and P. M. Hawkey. 2008. Imported chicken meat as a potential
465 source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in
466 the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 504 – 508.
467
- 468 38. Woodford N., E. J. Fagan, M. J. Ellington. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes
469 encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 154 – 155.
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481

482

483

484

485

486

487

488

489

490 **Table 1** – Prevalence of phylogenetic group and virulence genes in strains of *E. coli* isolated
 491 by free-range and conventionally raised poultry carcass

	Free-range (n=35)	Conventional (n=121)
	_____	_____
	No. of isolates (%)	No. of isolates (%)
Phylogenetic group		
A	19 (54.3)*	35 (28.9)
B1	09 (25.7)	45 (37.2)
B2	00 (0)	5 (4.1)
D	07 (20)	36 (29.7)
Virulence genes		
<i>hlyF</i>	09 (25.7)	57 (47.1)*
<i>iutA</i>	06 (17.1)	66 (54.5)*
<i>iss</i>	07 (20)	43 (35.5)
<i>ompT</i>	08 (22.8)	64 (52.8)*
<i>iroN</i>	01 (2.8)	35 (28.9)*

492 * $p < 0.05$ – Chi-square. Free-range vs. conventionally raised poultry carcass *E. coli* isolates

493

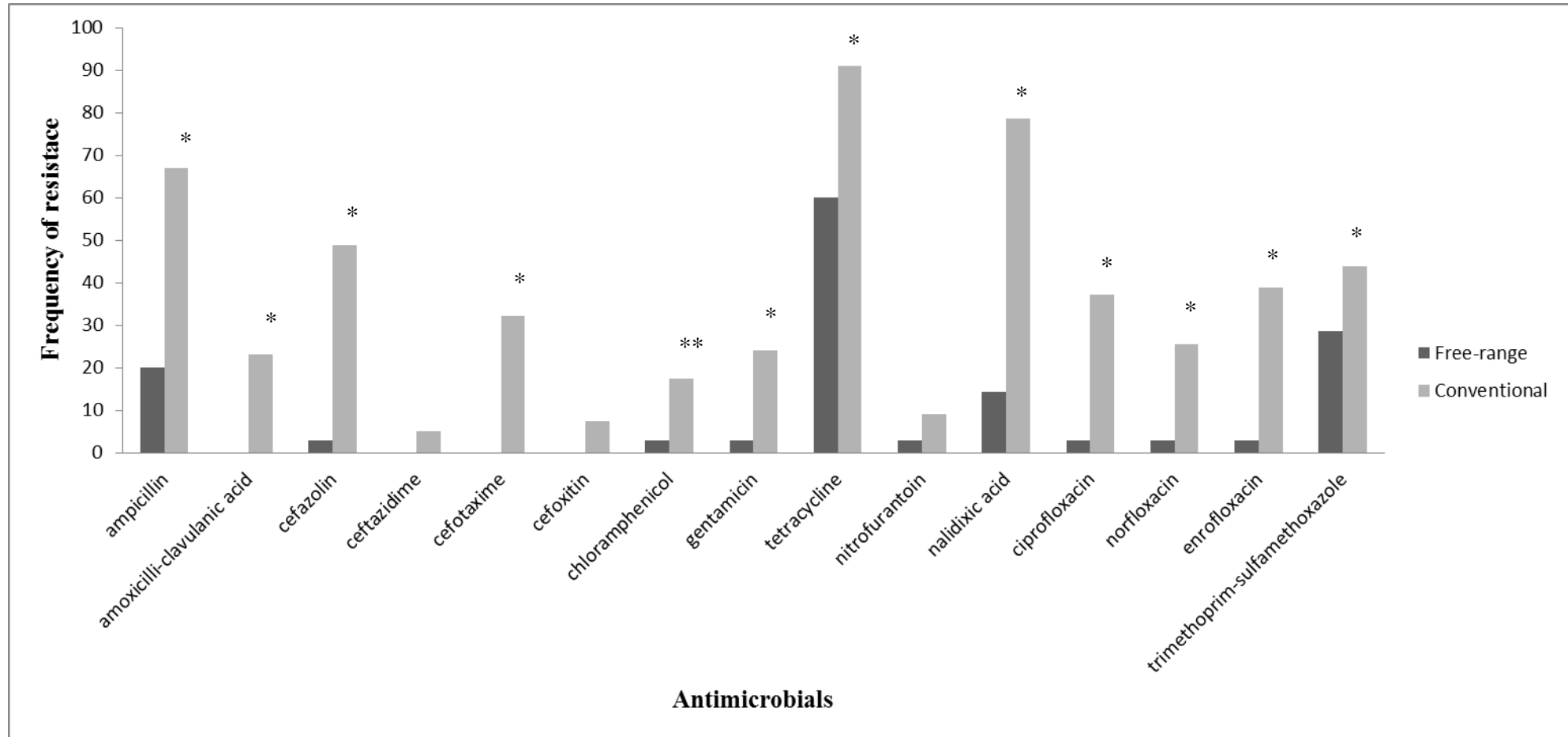


Figure 1 – Frequency of antimicrobial resistance to *E. coli* strains isolated from free-range and conventionally raised chicken carcass

* $p < 0.05$ - Chi-square test

** $p < 0.05$ – Fisher exact test

Table 2 – Characteristics of β -lactamase genes and phenotypic antimicrobial resistance profile of strains ESBL/AmpC-producing isolates

Isolate no.	Phenotypic resistance profile	β -lactamase genes
1	Amp, amc, cfz, ctxtet, nal	Group 1 CTX-M
2	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M
3	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M
4	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, sut	Group 2 CTX-M
5	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, enr	Group 2 CTX-M
6	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M
7	Amp, kz, ctx, clo, cn, nal, sut	Group 2 CTX-M
8	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M
9	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M
10	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal	Group 2 CTX-M
11	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, enr, sut	Group 2 CTX-M
12	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, enr	Group 2 CTX-M
13	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M

14	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, sut	Group 2 CTX-M
15	Amp, amc, kz, cn, tet, nal, sut	Group 2 CTX-M
16	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M
17	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M
18	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M
19	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal	Group 2 CTX-M
20	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, sut	Group 2 CTX-M
21	Amp, kz, ctx, cn, tet, nal, cip, enr	Group 2 CTX-M
22	Amp, amc, kz, ctx, tet, nit, nal	Group 2 CTX-M
23	Amp, amc, kz, ctx, cn, tet	Group 2 CTX-M
24	Amp, amc, kz, ctx, clo, tet, nit, nal, cip, nor, enr, sut	Group 8 CTX-M
25	Amp, kz, ctx, tet, enr	Group 8 CTX-M
26	Amp, kz, ctx, tet, nit	Group 8 CTX-M
27	Amp, amc, kz, ctx, clo, tet, nal, sut	Group 8 CTX-M
28	Amp, kz, ctx, tet	Group 8 CTX-M
29	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr	Group 8 CTX-M
30	Amp, kz, ctx, tet	Group 8 CTX-M

31	Amp, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, enr	Group 8 CTX-M
32	Amp, kz, ctx, tet	Group 8 CTX-M
33	Amp, kz, ctx, caz, tet	Group 8 CTX-M
34	Amp, kz, ctx, tet, nit	Group 8 CTX-M
35	Amp, kz, tet, nal, cip, nor, enr	SHV
36	Amp, amc, kz, clo, cn, tet, nit, sut	CIT
37	Amp, amc, kz, cfo, tet, nal, sut	CIT
38	Amp, amc, kz, cfo, cn, tet, nal, sut	CIT
39	Amp, amc, kz, cfo, caz, tet, nal, sut	CIT
40	Amp, amc, kz, cfo, tet, nal, sut	CIT
41	Amp, amc, kz, cfo, caz, tet, nal, cip, nor, enr, sut	CIT
42	Amp, amc, kz, cfo, tet, nal, sut	CIT
43	Amp, amc, kz, cfo, clo, cn, tet, nal, cip, nor, enr, sut	CIT
44	Amp, amc, kz, cfo, ctx, tet, nal, sut	CIT
45	Amp, amc, kz, cfo, caz, tet, nal, cip, enr, sut	CIT
46	Amp, amc, kz, cfo, caz, tet, nit, nal, cip, enr	CIT
47	Amp, amc, kz, ctx, caz, clo, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 1 CTX-M, Group 2 CTX-M

48	Amp, kz, ctx, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M, Group 8 CTX-M
49	Amp, amc, kz, ctx, tet, nal	Group 8 CTX-M, SHV
50	Amp, amc, kz, tet, nal	Group 8 CTX-M, SHV
51	Amp, amc, kz, ctx, clo, tet, nal, cip, nor, enr, sut	Group 2 CTX-M, Group 8 CTX-M, SHV

Abbreviations: ampicillin (AMP); amoxicilli-clavulanic acid (AMC); cefazolin (KZ); ceftazidime (CAZ); cefotaxime (CTX); chloramphenicol (CLO); gentamicin (CN); tetracycline (TET); nitrofurantoin (NIT); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); enrofloxacin (ENR); trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT).

6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- Amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango apresentam genes codificadores de fatores de virulência característicos de ExPEC;
- Houve um aumento na frequência de resistência para a maioria dos antimicrobianos testados de 2007 para 2013;
- Em 2013, foi encontrado amostras produtoras de ESBL, sendo que em 2007 nenhuma amostra apresentou essa enzima;
- Entre as ESBLs encontradas em 2013, o grupo 2 CTX-M foi o mais prevalente;
- Amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango “caipira” apresentam menos genes codificadores de virulência do que as amostras isoladas de frango de granja;
- As amostras isoladas de frango de granja apresentaram uma maior frequência de resistência para a maioria dos antimicrobianos testados, em relação as amostras de frango caipira;
- Nenhuma amostra isolada de frango caipira apresentou genes codificadores das enzimas ESBL e AmpC, diferentemente das amostras isolada de frango de granja, na qual, 42.1% amostras apresentavam ao menos uma das betalactamases;

- Os grupos 2CTX-M e CIT foram os mais prevalentes entre os genes codificadores de ESBL e AmpC em amostras isoladas de frango de granja, respectivamente
- O uso restrito de antimicrobianos na produção de frango caipira pela agricultura familiar pode estar relacionada com a baixa frequência de resistência e virulência em bactérias isoladas de carnes de frango.