



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

**MONITORAMENTO LONGITUDINAL E CARACTERIZAÇÃO
DE *ESCHERICHIA COLI* RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ISOLADAS DO AMBIENTE DE
PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE DO SUL DO BRASIL**

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G289m Gazal, Luís Eduardo de.

Monitoramento longitudinal e caracterização de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos isoladas do ambiente de produção de frango de corte do sul do Brasil / Luís Eduardo de Gazal. - Londrina, 2019.
101 f.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Coorientador: Benito Guimarães de Brito.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* resistente aos antimicrobianos - Tese. 2. Frango de corte - Tese. 3. Beta-lactâmicos - Tese. 4. Fosfomicina - Tese. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Brito, Benito Guimarães de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

**MONITORAMENTO LONGITUDINAL E CARACTERIZAÇÃO
DE *ESCHERICHIA COLI* RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ISOLADAS DO AMBIENTE DE
PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE DO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Co-orientador: Dr. Benito Guimarães de Brito


Londrina
2019

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

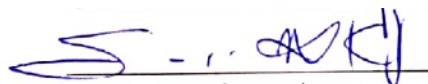
**MONITORAMENTO LONGITUDINAL E CARACTERIZAÇÃO DE
ESCHERICHIA COLI RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS
ISOLADAS DO AMBIENTE DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE
DO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Microbiologia

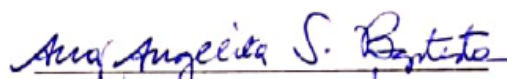
BANCA EXAMINADORA



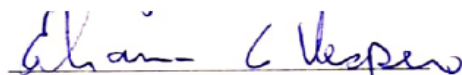
Orientadora: Profa. Dra. Renata Katsuko
Takayama Kobayshi
Universidade Estadual de Londrina – UEL



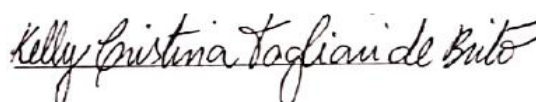
Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL



Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista
Universidade Estadual de Londrina – UEL



Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina – UEL



Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério
Finamor – IPVDF

Londrina, 23 de setembro de 2019.

**“Nós não somos o que gostaríamos de ser.
Nós não somos o que ainda iremos ser,
mas, graças a Deus, não somos mais quem
nós éramos”.**

(Martin Luther King Jr.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por toda força, superação e pelas pessoas que colocou em meu caminho. Só há gratidão pela vida que tenho e pelo caminho que escolhi.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Kobayashi, pela oportunidade, pela confiança, por toda atenção, dedicação e carinho com que me conduziu durante esses anos no doutorado. Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, também agradeço a confiança depositada em mim, por sua paciência e por seus conhecimentos. Aos dois sou grato por me transformarem no profissional que sou, pelo exemplo de educadores e pessoas que são. A vocês meu sincero respeito e admiração. Muito obrigado!

À Prof^a. Dr^a Kelly Cristina T. de Brito e ao Dr^o Benito Guimarães de Brito (Co-orientador), não apenas por fazerem parte do projeto, mas por tudo que fizeram por mim durante o doutorado. Obrigado pela dedicação e empenho que tiveram, e pelo carinho com que me receberam, pelos ensinamentos transmitidos e pelas oportunidades concedidas. Muito obrigado!

A Prof^a. Dr^a Ana Angelita Baptista Sampaio, por ter participado da banca examinadora da tese, pela troca de ideias, pelas críticas e sugestões no trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Eliana Carolina Vespero, por aceitar fazer parte da minha banca de doutorado, pelas correções e sugestões no trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos conhecimentos transmitidos contribuindo para minha formação acadêmica. E aos funcionários pelo apoio durante todo o período.

A todos os amigos do “NIP 3”, que desde o início me receberam de braços abertos no laboratório. Foi muito bom compartilhar cada momento com vocês, dividir experiências, ensinar e aprender. Tudo foi ótimo, e sempre guardarei na lembrança cada um de vocês. Muito obrigado a todos!!

A todo pessoal do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), em especial a todos os estagiários do Laboratório de Saúde das Aves e Inovação Tecnológica, pelo carinho com que me receberam no período que estive lá, pelo convívio e auxílio no projeto. A vocês meu muito obrigado!!

Aos Profs. Dr. Sandremir de Carvalho, Dr. Bruno Ambrósio Galindo e João Aparecido Galdino, por me incentivarem dentro da pesquisa e da educação.

Aos amigos da Universidade Estadual do Norte do Paraná, agradeço por todo apoio e incentivo, pela caminhada compartilhada e pela amizade de longa data.

Aos amigos que fiz na Universidade Estadual de Londrina, que trilham o mesmo caminho e que dividiram comigo momentos importantes durante todo este tempo.

Aos meus pais, irmãs e toda família, que sempre me apoiaram, me deram forças para seguir esta jornada. Nada seria sem nenhum de vocês. A vocês minha gratidão e amor por estarem em minha vida. Digo que todo o esforço valeu a pena.

À minha namorada, Caroline, que sempre esteve ao meu lado, dividindo cada alegria e cada momento difícil, com muito amor e carinho. Obrigado por me incentivar a todo tempo e por fazer parte da minha vida.

A Prof^a. Dr^a Mariangela Hungria da Cunha e Dr. Renan Augusto Ribeiro do Laboratório de Microbiologia de Solo (EMBRAPA), e a Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia, pela colaboração no projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem a qual não teria sido possível a minha dedicação total ao presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitou a execução deste trabalho.

Àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

GAZAL, Luís Eduardo de Souza. **Monitoramento longitudinal e caracterização de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos isoladas do ambiente de produção de frango de corte do sul do Brasil**. 2019. 102 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Escherichia coli resistente a antimicrobianos como fosfomicina, colistina, além das produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC tem emergido na saúde humana. O uso não racional de antimicrobianos na avicultura contribui com a seleção de bactérias resistentes nestes ambientes, com a possibilidade de transmissão destas cepas ao homem, por meio da cadeia alimentar. Desta forma, o objetivo do nosso estudo foi realizar um monitoramento longitudinal em granjas de frango de corte no sul do Brasil, visando determinar pontos críticos durante a produção das aves para a ocorrência de *E. coli* multirresistente. Para isso, foram realizadas três coletas em oito granjas (três Paraná e cinco Rio Grande do Sul), em período distintos (1º dia de produção; 18º ao 22º dia; 40º dia), entre os meses de fevereiro de 2016 a março de 2018. Foram coletadas amostras de cama de aviário, suabe de cloaca, ração, água e “cascudinhos” (*Alphitobius* sp.). Todas *E. coli* isoladas foram submetidas a testes de antibiograma para verificar a susceptibilidade aos antimicrobianos e confirmar a produção de ESBL. Além disso, o método de PCR foi aplicado para investigar a presença de genes que conferem resistência aos antimicrobianos, os grupos filogenéticos e os grupos de incompatibilidade plasmidial (*Inc Group*). Cinquenta e oito *E. coli* do PR e 59 *E. coli* do RS foram isoladas, totalizando 117. Uma alta frequência de multirresistência foi observada entre os isolados do PR (90%) e do RS (70%). Aproximadamente, 67% foram positivas para a produção de ESBL. Por meio da análise de regressão logística foi possível verificar a razão de chances (OR) da presença de *E. coli* produtora de ESBL em função da origem de isolamento. *E. coli* produtora de ESBL tem 4.33 vezes mais chances de ser encontrada na cama de frangos e 612 vezes mais chances em cascudinhos. O gene codificando para β -lactamases do tipo ESBL predominante foi o *bla*_{CTX-M2}. Referente ao tipo AmpC foram encontrados apenas o gene *cit*, em 13% dos isolados. O gene da colistina foi observado em apenas um isolado do RS, entretanto, cerca de 26 isolados do PR foram resistentes a fosfomicina e 19 apresentaram o gene *fosA3*. Surpreendentemente, foi observado que o gene *fosA3* tem aproximadamente 17 vezes mais chances de estar associado ao gene *bla*_{CTX-M1}, indicando que o uso de fosfomicina na produção pode co-selecionar cepas produtoras de ESBL. Este é o primeiro relato da presença de *E. coli* abrigando o gene *fosA3* isolada da produção de frangos de corte no Brasil. A fosfomicina é um importante antimicrobiano usado na clínica humana, e seu uso na avicultura é de grande preocupação à saúde pública. Nosso estudo sugere que a cama de frango e os cascudinhos são pontos críticos dentro da produção de frangos de corte e uma potencial fonte de bactérias multirresistentes. Dessa forma, estratégias de monitoramento e melhorias nas práticas de manejo devem ser elaboradas a fim de reduzir o número de bactérias multirresistentes neste ambiente.

Palavras Chave: β -lactâmicos. *E. coli*. Multirresistência. Fosfomicina. Frangos.

GAZAL, Luís Eduardo de Souza. **Longitudinal monitoring and characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from broiler chicken production environment in southern Brazil**. 2019. 102 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Escherichia coli resistant to antimicrobials such as fosfomicin, colistin, as well as producers of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC have emerged in human health. The non-rational use of antimicrobials in poultry contributes to the selection of resistant bacteria in these environments, with the possibility of transmission of these strains to humans through the food chain. Thus, the objective of our study was to perform longitudinal monitoring in poultry farms in southern Brazil, aiming to determine critical points during poultry production for multiresistant *E. coli* occurrence. For this, three collections were performed in eight farms (three in Paraná and five in Rio Grande do Sul), in different periods (1st day of production; 18th to 22nd day; 40th day), between February 2016 and March 2018. Samples were collected from poultry litter, cloaca swab, feed, water and "little beetle" (*Alphitobius* sp.). All isolated *E. coli* underwent antibiogram tests to check antimicrobial susceptibility and confirm ESBL production. In addition, the PCR method was applied to investigate the presence of genes that confer resistance to antimicrobials, phylogenetic groups and plasmid incompatibility groups (Inc Group). Fifty-eight *E. coli* from PR and 59 *E. coli* from RS were isolated, totaling 117. A high frequency of multidrug resistance was observed among PR (90%) and RS (70%) isolates. Approximately 67% were positive for ESBL production. Through logistic regression analysis it was possible to verify the odds ratio (OR) of the presence of ESBL-producing *E. coli* as a function of the isolation source. ESBL producing *E. coli* were found to be 4.33 times more likely in poultry litter and 612 times more chance in little beetle. The predominant ESBL type β -lactamases coding gene was *bla*_{CTX-M2}. References to the AmpC type were found only in the *cit* gene in 13% of isolates. The colistin gene was observed in only one RS isolate, however, about 26 PR isolates were fosfomicin resistant and 19 presented the *fosA3* gene. Surprisingly, it was observed that the *fosA3* gene is approximately 17 times more likely to be associated with the *bla*_{CTX-M1} gene, indicating that the use of fosfomicin in production may co-select ESBL-producing strains. This is the first report of the presence of *E. coli* harboring the *fosA3* gene isolated from broiler production in Brazil. Fosfomicin is an important antimicrobial used in the human clinic, and its use in poultry farming is of great public health concern. Our study suggests that poultry litter and little beetle are critical points within broiler production and a potential source of multidrug resistant bacteria. Therefore, monitoring strategies and improvements in management practices should be designed to reduce the number of multidrug resistant bacteria in this environment.

Key-words: β -lactams. *E. coli*. Multidrug resistance. Fosfomicin. Poultry.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

- Figure 1.** Distribution of ESBL-producing and non-ESBL-producing *E. coli* during the sampling periods86
- Figure 2.** Resistance of ESBL-producing and non-ESBL-producing *E. coli* strains isolated from poultry farms in southern Brazil. There were significant differences between ESBL-producing and non-producing strains ($p < 0.05$), except for nitrofurantoin and imipenem (all isolates were sensitive).....86
- Figure 3.** ERIC-PCR dendrogram of 58 *E. coli* strains isolated from PR poultry farms87
- Figure 4.** ERIC-PCR dendrogram of 59 *E. coli* strains isolated from RS poultry farms 101

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1.	Detection of ESBL-producing <i>E. coli</i> isolated in MC/CTX agar of sampling from farms in PR e RS	89
Table 2.	Phenotypic and genotypic characteristics of <i>E. coli</i> strains isolated from poultry farms in Paraná.....	90
Table 3.	Phenotypic and genotypic characteristics of <i>E. coli</i> strains isolated from poultry farms in Rio Grande do Sul.....	93
Table 4.	Distribution of ESBL-producing <i>E. coli</i> strains according to combination genes and sources in PR and RS states	96
Table 5.	Phylogenetic distribution of 78 ESBL producing <i>E. coli</i> strains and 39 non-ESBL-producing <i>E. coli</i> strains according to isolate source	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulânico
APEC	<i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPP	Boas Práticas de Produção
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
DANMAP	<i>Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme</i>
DEC	<i>Diarrheagenic Escherichia coli</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fosfomicina
IMP	Imipenem
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MARAN	<i>Monitoring of Antimicrobial Resistance and antibiotic usage in Animal in the Netherlands</i>
NAL	Ácido Nalidíxico
NIT	Nitrofurantoína
NOR	Norfloxacina

OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PBRT	<i>PCR-Based Replicon Typing</i>
PCCAP	Pontos Críticos de Controle e Análise de Perigo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	<i>Phylogenetic Group</i>
PMQR	<i>Plasmid-mediated Quinolone Resistance</i>
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TCS	<i>Two-Component System</i>
TET	Tetraciclina
UEL	Universidade Estadual de Londrina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	13
2.0	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Panorama da produção de frangos de corte mundial	16
3.2	Utilização e regulamentação de antimicrobianos na avicultura	17
3.3	Antimicrobianos e os mecanismos de resistência	18
3.3.1	β -lactâmicos	18
3.3.2	Fosfomicina	21
3.3.3	Colistina	22
3.3.4	Quinolonas	23
3.3.5	Tetraciclina	25
3.4	<i>Escherichia coli</i>	26
3.5	Mecanismos de transferência de resistência aos antimicrobianos	27
3.6	<i>Escherichia coli</i> resistente aos antimicrobianos na produção de frangos de corte	28
3.7	Programas de monitoramento de resistência bacteriana aos antimicrobianos	30
3.8	Conceito de <i>One Health</i> e a importância do monitoramento da resistência aos antimicrobianos	33
4.0	REFERÊNCIAS	35
5.0	ARTIGO CIENTÍFICO	55
6.0	CONCLUSÃO	102

1.0 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem se destacado no mercado internacional como grande produtor e exportador de carne de frango, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). Atualmente, o país é o maior exportador do produto no mundo, com aproximadamente 4,3 milhões de toneladas, e ocupa a segunda colocação como produtor, com aproximadamente 13 milhões de toneladas de carne de frango produzidas em 2017. A região sul concentra a maior parte da produção de frango de corte nacional, representando 64%, liderado pelo estado do Paraná que detêm 34% da produção. Cerca de 67% da produção de 2017, ou seja, em torno de 8,7 milhões de toneladas foram destinados ao mercado interno e o consumo *per capita* de carne foi de 42 kg/hab (ABPA, 2018). Tendo em vista esse cenário, fica claro a importância do setor para a economia, para a sociedade brasileira, e para sua visibilidade no mercado internacional. Assim, a busca por melhoras na produção e na qualidade do produto são necessárias para consolidar a produção brasileira no mercado mundial.

Durante a produção, o manejo e a aplicação de boas práticas de biossegurança são essenciais para a obtenção de bons resultados. Entretanto, no tipo de produção de frangos de corte, caracterizada por um sistema intensivo, é inevitável a presença de bactérias patogênicas. Dessa forma, a utilização de antimicrobianos é realizada para minimizar os problemas causados por tais microrganismos na sua produção. A aplicação desses antimicrobianos pode ser realizada para fins profiláticos, terapêuticos ou para promoção do crescimento das aves (BEZERRA et al., 2017). Porém, discute-se muito a administração desses antimicrobianos na produção em vista dos problemas associados ao surgimento de bactérias resistentes. Diversos são os trabalhos mostrando o perfil de resistência de bactérias isoladas de carcaças de frango (KOGA et al., 2015; KOGA et al., 2019; CYOIA et al., 2019). No Brasil, ao longo dos últimos anos diversas normativas foram implementadas proibindo a utilização de certos antimicrobianos, como por exemplo β -lactâmicos, como promotores de crescimento (MAPA, 2019a). Entretanto, ainda é observado que muitos isolados bacterianos, oriundos de frangos de corte, apresentam resistência a estes antimicrobianos, tornando necessária uma

pesquisa mais acurada quanto as fontes destes microrganismos multirresistentes.

Entre as bactérias mais pesquisadas em amostras de frangos está *E. coli*, um bacilo Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, que habita o trato gastrointestinal de animais de sangue quente incluindo o homem. Por ser comum à microbiota destes animais e ser responsável por doenças intestinais e extra-intestinais no homem, *E. coli* se apresenta como um importante modelo de estudo (DE JONG et al., 2011). Além disso, o fácil crescimento em condições laboratoriais e a versatilidade genética, que permitem *E. coli* adquirir e excisar genes de virulência e de resistência com facilidade (DONNENBERG, 2013), mostram que esta bactéria pode se apresentar como indicadora da presença desses genes no ambiente.

Nos últimos anos, muitas pesquisas envolvendo *E. coli* e seu perfil de resistência foram realizadas, sobretudo aquelas que investigaram a presença de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC (EWERS et al., 2012; POIREL et al., 2018; SALIU et al., 2017;). Bactérias produtoras de ESBL/AmpC foram observadas inicialmente na medicina humana, entretanto estudos recentes mostram que estas bactérias estão cada vez mais presentes na produção de frangos de corte (SMET et al., 2009; DIERIKX et al., 2013; LAUBE et al., 2013; LAUBE et al., 2014; BLAAK et al., 2015; KOGA et al., 2015; DIERIKX et al., 2018; CYOIA et al., 2019; KOGA et al., 2019). Na produção animal, antimicrobianos β -lactâmicos como as cefalosporinas, selecionam bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de ESBL/AmpC, como *E. coli* (EFSA, 2011). Os genes que codificam essas enzimas (genes *bla*) podem estar inseridos em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons, e assim facilmente serem transferidos aos membros da família Enterobacteriaceae.

Este trabalho teve a finalidade de monitorar o ambiente de produção dos frangos de corte, com o intuito de verificar pontos críticos durante a produção, que influenciassem na disseminação ou permanência de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Monitorar e caracterizar a presença de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC na produção de frangos de corte.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar *E. coli* produtora de ESBL/AmpC dos pintainhos, frangos e elementos da produção (água, ração, cama de frango e cascudinho).

- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente *E. coli* produtoras de ESBL/AmpC.

- Pesquisar genes de resistência a fosfomicina e colistina.

- Classificar os plasmídeos envolvidos na resistência quanto aos grupos de incompatibilidade (*Inc. group*).

- Verificar a quais grupo filogenético pertencem os isolados.

- Avaliar a similaridade clonal entre os isolados de *E. coli* produtora de ESBL.

- Avaliar os fatores de risco envolvidos na ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama da produção de frangos de corte mundial

Nas décadas de 70 e 80, o aumento da população mundial e da urbanização, promovida pelo êxodo rural, estimulou a intensificação da produção de frangos de corte (KORB, 2014). Aves que inicialmente eram criadas de forma livre (aves caipiras) passaram a ser criadas em um sistema de confinamento, possibilitando o aumento do número de aves por granja, e conseqüentemente, um aumento na produtividade (NARROD; TIONGO, 2012). As mudanças tecnológicas aplicadas na produção foram um dos principais fatores que impulsionaram o crescimento da avicultura no mundo (MOTTET; TEMPIO, 2017). No Brasil, até a década de 50, a avicultura era uma atividade basicamente de subsistência e não possuía recursos ou incentivos empresariais para seu desenvolvimento. Porém, a partir da década de 60, linhagens híbridas vindas dos Estados Unidos foram introduzidas no sistema e melhoramentos gradativos no manejo das aves otimizaram os padrões de criação (VIEIRA; DIAS, 2005). Na década de 70, as indústrias avícolas foram se modernizando, graças a novas políticas agrícolas de crédito subsidiado e instalação de frigoríficos (RIZZI, 1993). Além disso, métodos de melhoramento genético em aves foram implantados, vacinas foram desenvolvidas e inovações tecnológicas introduzidas (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

Nos últimos anos, a economia mundial de alimentos observou mudanças significativas no aumento do consumo de produtos de origem animal (ROBINSON et al., 2014). Um relatório produzido pela Divisão de Comércio e Mercado da *Food and Agriculture Organization* (FAO) estima que a produção global de carnes, prevista para todo o ano de 2019, será de 337 milhões de toneladas. O relatório mostrou ainda um aumento de 2,8% na produção de carnes de frango em 2019, comparado ao ano de 2018 (FAO, 2019). A carne de frango e ovos estão entre os alimentos de origem animal mais consumidos mundialmente (MOTTET; TEMPIO, 2017). Entre os anos de 1961 e 2009, o consumo global de carne de frango *per capita* aumentou de 2,88 kg para 14 kg (FAOSTAT, 2019). Este aumento no consumo foi reflexo do crescimento no setor, após a intensificação e modernização na produção de frangos de corte.

Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2017, os Estados Unidos produziram cerca de 18,5 milhões toneladas de carne de frango, seguido pelo Brasil (13 milhões toneladas) e pela União Europeia (11,7 milhões toneladas). O mesmo relatório ainda aponta que o Brasil lidera o ranking mundial de exportações, fornecendo aproximadamente cerca de 4,3 milhões de toneladas de carne de frango a diversos países, principalmente aos do Oriente Médio (ABPA, 2018). No país, a região sul detém grande parte da produção nacional de frangos de corte, atingindo 64%. O estado do Paraná é o líder nacional, totalizando em 2017, a produção de aproximadamente 1,7 bilhões de aves (ABPA, 2018; SINDIAVIPAR, 2019).

3.2 Utilização e regulamentação de antimicrobianos na avicultura

A introdução dos antimicrobianos na veterinária ocorreu logo após a comercialização desses fármacos na saúde humana. Alguns fármacos são de uso exclusivo na veterinária, entretanto, pertencem as mesmas classes de antimicrobianos utilizados na saúde humana (VAN PUYVELDE; DEBORGGRAEVE; JACOBS, 2018). Na década de 40, os antimicrobianos tinham sido introduzidos na produção de frangos de corte com o intuito de melhorar a produtividade (STOKSTAD et al., 1949). Guardabassi e Kruse (2008) descrevem quatro formas de administração desses fármacos na produção: (1) como medida terapêutica, onde a aplicação é realizada individualmente para tratamento do animal doente; (2) como medida profilática, na prevenção de possíveis doenças; (3) como medida metafílica, aplicada a todos os animais de um lote, onde uma parcela apresenta sinais clínicos (tipicamente utilizada durante um surto); (4) como promotores de crescimento, onde o propósito é utilizar estes fármacos como suplementos nas rações, em doses subterapêuticas, para reduzir a conversão alimentar e aumentar o ganho de peso dos animais.

Diversas classes de antimicrobianos como - glicopeptídeos, beta-lactâmicos, quinolonas, estreptograminas, macrolídeos, tetraciclina e sulfonamidas - podem ser usadas na produção animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). As vantagens econômicas e na saúde animal proporcionadas pelo uso dos antimicrobianos revolucionaram a pecuária mundial (APATA, 2011). Entretanto, devido aos problemas relacionados a resistência aos

antimicrobianos, diversos países têm proibido o uso de muitos desses fármacos para promoção de crescimento na dieta animal. A União Europeia proibiu a venda de antimicrobianos para fins de promoção de crescimento na produção animal a partir de janeiro de 2006 (REGULATION (EC) n° 1831/2003, 2003). Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) sugeriu a retirada progressiva de antimicrobianos administrados para o mesmo fim (US FDA, 2013). Segundo relatório do órgão publicado em 2018, houve uma redução de 28% do montante de antimicrobianos vendidos para uso veterinário entre os anos de 2009 e 2017 (US FDA, 2018).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Lei 6.198 de 26/12/1974 regulamentada pelo Decreto 6.296 de 11/12/2007 (BEZERRA et al., 2017). Desde 1998, vários antimicrobianos são proibidos na produção animal para esta finalidade, como: avoparcina (Ofício DFPA n° 047/1998), cloranfenicol e nitrofuranos (Instrução Normativa 9, 27 de maio de 2003), anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (Instrução Normativa 26, 9 de julho de 2009, revoga portaria 193/1998), espiramicina e eritromicina (Instrução Normativa 14, 17 de maio de 2012), sulfato de colistina (Instrução Normativa 45, 22 de novembro de 2016). Recentemente, o uso de tilosina, lincomicina, virginamicina, bacitracina e tiamulina também foram restringidos, por meio da Portaria 171, de 13 de dezembro de 2018. Considerando a última portaria de 2018, ainda são liberados para o uso os agentes, clorexidina, enramicina, halquinol e flavomicina (MAPA, 2019a).

3.3 Antimicrobianos e os mecanismos de resistência

3.3.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são a classe mais utilizada de antimicrobianos no combate a infecções bacterianas e possuem uma ampla quantidade de compostos. Desde a descoberta da benzilpenicilina, na década de 20 por Alexander Fleming, muitos derivados da penicilina e outros compostos foram descobertos (BUSH; BRADFORD, 2016). Todos os antimicrobianos desta

classe caracterizam-se por compartilharem um anel β -lactâmico, presente no centro da molécula, responsável pela atividade antimicrobiana (PRESCOTT, 2006). Atualmente, os β -lactâmicos são divididos em 4 grupos, baseados na estrutura molecular. Três grupos possuem uma estrutura bicíclica, ou seja, um segundo anel fundido ao anel β -lactâmico. Esses grupos são: as penicilinas (anel tiazolidina); as cefalosporinas (anel di-hidrotiazina); e os carbapenêmicos (pirrolina). O quarto grupo, chamado de monobactâmicos, apresenta um sistema monocíclico (TOOKE et al., 2019).

Além desses grupos, existem substâncias que atuam como importantes inibidores de β -lactamases (enzimas que degradam os antimicrobianos β -lactâmicos). Estas substâncias apresentam semelhanças com as moléculas dos β -lactâmicos, entretanto, possuem baixa atividade antimicrobiana (DECK; WINSTON, 2017). Um dos principais inibidores de β -lactamases é o ácido clavulânico. Este antimicrobiano isolado de *Streptomyces clavurigerus*, atua como um potente inibidor de β -lactamases, e atua sinergicamente com penicilinas e cefalosporinas contra bactérias entéricas produtoras dessas enzimas (BUSH; BRADFORD, 2016; READING; COLE, 1977).

Em 1965, Tipper e Strominger descreveram pela primeira vez o mecanismo de ação dos β -lactâmicos. O anel β -lactâmico mimetiza a porção terminal do pentapeptídeo (D-alanina-D-alanina) lateral da peptídeoglicana, que compõe a parede celular bacteriana. Dessa forma, o anel β -lactâmico liga-se ao resíduo de serina das transpeptidases (chamadas de *Penicillin Binding Proteins* – PBPs), impedindo que estas enzimas realizem a ligação cruzada entre as cadeias glicana, desestabilizando a parede celular bacteriana (TIPPER; STROMINGER, 1965).

Entre os mecanismos de resistência conhecidos aos β -lactâmicos, o mais prevalente entre as bactérias ocorre pela produção de β -lactamases (LIVEMORE, 2012). Atualmente, mais de 2000 β -lactamases são identificadas baseadas em sua característica de hidrólise e sequência de aminoácidos única. A nomenclatura dessas enzimas pode seguir critérios como, substrato de atuação (FOX), local de descoberta (OHIO) ou nome do paciente no qual a bactéria foi isolada (Temoniera - TEM) (BONOMO, 2017). As β -lactamases podem ser classificadas com base em suas características bioquímicas

(enzimáticas) (BUSH; JACOBY, 2010) ou de acordo com suas estruturas moleculares. (AMBLER, 1980). O esquema proposto por Bush e Jacoby divide as enzimas em grupos de 1 a 4, e baseia-se no substrato de preferência da enzima e de sua inativação por inibidores específicos. Já o esquema proposto por Ambler, classificam as enzimas nos tipos A, B, C e D, levando em consideração a similaridade da estrutura enzimática e sequência de aminoácidos (BONOMO, 2017).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) possuem a capacidade de hidrolisar um amplo espectro de antimicrobianos β -lactâmicos, como as penicilinas, as cefalosporinas de 3° e 4° geração e o aztreonam, porém são inibidas pelo ácido clavulânico (DIERKX et al., 2013). As ESBL pertencem ao grupo A do esquema de Ambler, e aos grupos 2be e 2d do esquema de Bush-Jacoby (DHILLON; CLARK, 2011). Os genes que codificam as enzimas ESBL (*bla*) podem estar inseridos em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, *integrons* e *transposons*. Entre as várias famílias de ESBL as mais comuns são a SHV (*bla*_{SHV}), TEM (*bla*_{TEM}) e a CTX-M (*bla*_{CTX-M}) (CARATTOLI, 2008; SMET et al., 2009).

As β -lactamases 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, contendo um gene cromossomal presente em *Kluyvera spp.* 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 (CANTÓN; COQUE, 2006; CANTÓN et al., 2008). A primeira β -lactamase 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, TEM-2 e SHV-1, codificadas por genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} (CANTÓN et al., 2008).

As β -lactamases do tipo AmpC conferem à bactéria resistência às penicilinas, cefalosporinas de 2° e 3° geração e não são inibidas pelo ácido clavulânico, entretanto são sensíveis às cefalosporinas de 4° geração e aos carbapenêmicos (DIERKX et al., 2013; EFSA, 2011). Pertencem ao grupo C no esquema de Ambler e ao grupo 1 no esquema de Bush-Jacoby (DHILLON;

CLARK, 2011). São codificadas em genes cromossômicos ou plasmidiais, e atualmente, as AmpC associadas a plasmídeos são divididas em 6 grupos (CIT, MOX, EBC, FOX, DHA e ACC) (JACOBY, 2009).

3.3.2 Fosfomicina

A fosfomicina, inicialmente denominada como “fosfomicina”, é um composto antimicrobiano antigo, descoberto em 1969 na Espanha. É produzido por espécies do gênero *Streptomyces*, como por exemplo, *S. fradiae*, *S. viridochromogenes* e *S. wedmorensis* (HENDLIN et al., 1969). Este antimicrobiano é um derivado de ácido fosfônico e apresenta um peso molecular baixo, com cerca de 183 Da (RAZ, 2011). A fosfomicina pode ser encontrada em duas formas para administração: (1) fosfomicina-trometamol (FOT) e fosfomicina cálcica (FOC) para via oral; (2) fosfomicina sódica para via parenteral. Entre as opções para administração oral, a FOT (biodisponibilidade de 40%) é a formulação mais utilizada, uma vez que é rapidamente absorvida pelo sangue, se comparada a FOC (biodisponibilidade de 12%) (MICHAPOPOULOS; LIVIDITIS; GOUGOUTAS, 2011).

Com relação ao seu mecanismo de ação, a fosfomicina atua como um agente bactericida, onde inibe a síntese de peptidoglicano (FALAGAS et al., 2016). A fosfomicina atua no primeiro passo da síntese do precursor de peptidoglicano, o ácido UDP-N-acetilmurâmico (UDP-MurNAc), ligando-se covalentemente ao sítio ativo da enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferase (MurA), inativando-a. Esta proteína MurA, catalisa a reação de transferência do grupo enolpiruvil para o grupo 3'-hidroxil de UDP-N-acetilglucosamina (UNAG) (ESCHENBURG; PRIESTMAN; SCHÖNBRUNN, 2005). O mecanismo de ação da fosfomicina se mostra único se comparada a outros antimicrobianos como os β -lactâmicos ou glicopeptídeos. Isso mostra que a fosfomicina pode atuar em sinergismo com outros antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e β -lactâmicos (CHIN; NEU; NEU, 1986).

Alguns dados de susceptibilidade *in vitro*, sugerem que a fosfomicina possui um grande atividade contra bactérias gram-negativas da família das Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus mirabilis*) e também contra bactérias gram-positivas como *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*

(especialmente vancomicina resistente), *Staphylococcus aureus* (especialmente meticilina resistente) e *S. epidermidis* (FALAGAS et al., 2016). Entretanto, algumas bactérias gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, possui resistência intrínseca a fosfomicina (FALAGAS et al., 2009).

A resistência a fosfomicina pode ocorrer por meio de mutações no gene *murA* que leva a modificações no sítio ativo da enzima MurA, impedindo a ligação do antimicrobiano. A molécula de fosfomicina utiliza os mesmos canais de transporte para o glicerol e outros carboidratos. Assim, mutações em genes estruturais que codificam esses transportadores (GlpT e UhpT) também podem tornar as bactérias resistentes a fosfomicina (FALAGAS et al., 2018).

As bactérias podem adquirir genes codificados em plasmídeos que conferem resistência a fosfomicina. A enzima Fos (codificada pelo gene *fosA*) utiliza íons de manganês (Mn^{+2}) ou potássio (K^+) como cofatores e modifica a molécula da fosfomicina por adição de um grupo sulfidril (VENKATESWARAN; WU, 1972). O gene é amplamente encontrado em Enterobacteriaceae e novos subtipos têm sido identificados: *fosA2*, *fosA3*, *fosA5*, *fosA6* (FALAGAS et al., 2018).

3.3.3 Colistina

A colistina pertence à classe das polimixinas, isoladas do microrganismo *Paenibacillus polymyxa* (REBELO et al., 2018). Também conhecida como polimixina E, foi descoberta na década de 40, e utilizada no combate de infecções causadas por bactérias gram-negativas (LIM et al., 2010). São peptídeos catiônicos que interferem na membrana externa carregada negativamente levando ao rompimento da estrutura e consequente morte da bactéria (GISKE, 2015). Devido a sua toxicidade e a falta de estudos com relação a sua farmacocinética e farmacodinâmica, o uso da colistina para tratamento declinou entre os anos de 1970 e 1990 (LI et al., 2006). Nos últimos anos o composto foi reintroduzido como um antimicrobiano de último recurso contra infecções por bactérias multirresistentes (WANG et al., 2017). Uma das formas disponíveis da colistina é o sulfato de colistina, um composto catiônico estável, administrado topicamente (LI et al., 2003). A colistina possui porções

hidrofílicas e lipofílicas que interagem eletrostaticamente com a membrana externa das bactérias Gram-negativas, mais especificamente com a porção lipopolissacarídica (LPS) (MOFFATT et al., 2010). Essa interação competitiva desloca certos íons divalentes, como magnésio e cálcio, presentes nos lipídios de membrana (DIXON; CHOPRA, 1986), causando o rompimento da membrana. A colistina, além de causar a morte celular por lise da membrana, atua como antiendotoxina, devido sua afinidade pelo LPS (LI et al., 2005).

Assim, alterações nas moléculas de LPS diminuem a interação entre a membrana externa e as polimixinas. Isso é possível pela adição de porções catiônicas como a fosfoetanolamina (pEtN) ou 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) a grupos fosfato presente no lipídio A do LPS. A adição dessas moléculas reduz a carga aniônica da superfície celular (JEANOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017), e conseqüentemente a força de interação. Essas modificações envolvem a ativação de um sistema de dois componentes (*Two-component system* – TCS) que regula a expressão dos genes responsáveis pelas modificações da estrutura do LPS (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Esses TCS são sistemas presentes em diversas bactérias que auxiliam na regulação da expressão de diferentes fatores de virulência e resistência (GIRARDELLO; GALES, 2012).

Além da resistência mediada por genes cromossomais, existem também genes que conferem resistência a colistina associados a plasmídeos. Na China, um grupo de pesquisadores detectaram pela primeira vez o gene *mcr-1* presente em um plasmídeo carregado por uma cepa de *E. coli* (LIU et al., 2016). O gene codifica uma enzima que adiciona uma pEtN ao lipídio A que compõe o LPS, conferindo assim resistência a colistina (MACNAIR et al., 2018). Atualmente 5 genes *mcr* são descritos (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*) e foram isolados de membros da família Enterobacteriaceae (REBELO et al., 2018).

3.3.4 Quinolonas

Os agentes antimicrobianos, pertencentes a classe das quinolonas, são produzidos sinteticamente em laboratório, ou seja, não são produtos do metabolismo de microrganismos (ANDRIOLE, 2005). O primeiro agente

conhecido desta classe foi o ácido nalidíxico, descoberto acidentalmente por Leshner e colaboradores em 1962, durante a síntese da cloroquina, um composto antimalárico (LESHNER et al., 1962).

Essencialmente, as quinolonas possuem como alvos na célula bacteriana duas enzimas topoisomerasas, a DNA topoisomerase do tipo IV e a DNA girase (HOOPER; JACOBY, 2016). A topoisomerase do tipo IV é composta por dois pares de subunidades chamadas de ParC e ParE e possui uma forte atividade de desencadeamento ou decatenação, quebrando e unindo o DNA (REECE; MAXWELL, 1991). Assim como a topoisomerase do tipo IV, a DNA girase possui dois pares de subunidades, chamadas de GyrA e GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente, e atuam no superenovelamento do DNA (KAMPRANIS; MAXWELL, 1996).

As quinolonas ligam-se de forma reversível às topoisomerasas, próximo ao sítio ativo da enzima, que está ligada provisoriamente ao DNA (LAPONOGOV et al., 2009). Assim, quando as forquilhas de replicação ou processos transcricionais se deparam com os complexos enzimáticos estabilizados pelos agentes da classe das quinolonas, quebras cromossômicas permanentes ocorrem, levando a morte celular (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

A resistência às quinolonas/fluoroquinolonas pode ocorrer por meio da expressão de genes de resistência plasmidiais (mediados ou adquiridos por plasmídeos), por genes de resistência cromossomais e/ou por mutações no DNA, que alteram a composição do gene, e conseqüentemente, a forma da enzima (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). Quanto a resistência por mutações, uma simples mudança de um aminoácido que compõe a DNA girase ou a topoisomerase do tipo IV, pode conferir resistência as quinolonas. (HOOPER; JACOBY, 2016). A segunda forma de resistência as quinolonas/fluoroquinolonas ocorre por meio de genes plasmidiais (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, AAC(6')-Ib-cr, *oqxAB*, *qepA*). A resistência as quinolonas mediada por plasmídeos (*Plasmid-mediated quinolone resistance* – PMQR) foi relatada no final dos anos 90, cerca de 12 anos após a aprovação do uso do ácido nalidíxico (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998). Por fim, a terceira forma de resistência as quinolonas se dá através de genes de

resistência presentes no cromossomo bacteriano. A entrada ou influxo das drogas se dá por meio de sua passagem pela parede e membrana celular. Diferentemente das bactérias gram-positivas, as bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa, o que confere uma barreira adicional para entrada de fármacos. Assim, o influxo desses fármacos pode ser facilitado por canais chamados de porinas, presente em gram-negativas (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). Genes presentes no cromossomo bacteriano regulam a expressão desses canais, e assim na presença de agente antimicrobianos como as quinolonas, a expressão é diminuída conferindo assim uma certa resistência (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2008).

3.3.5 Tetraciclina

As tetraciclinas foram descobertas na década de 40, em um estudo conduzido por Duggar e colaboradores (1948). Neste estudo, o composto “aureomicina” foi obtido de culturas de *Streptomyces aureofaciens*, denominado posteriormente de clortetraciclina (DUGGAR, 1948). Já em 1950, Finlay e colaboradores isolaram um metabólito secundário de *Streptocymes rimosus* inicialmente chamado de terramicina e depois oxytetraciclina (FINLAY et al., 1950). Tanto a clortetraciclina quanto a oxytetraciclina compõe a primeira geração de antimicrobianos desta classe. Ao longo dos anos, modificações foram realizadas a fim de melhorar as propriedades farmacocinéticas, aumentar o potencial antimicrobiano e diminuir a toxicidade, dando origem a novas gerações (NGUYEN et al., 2014). As tetraciclinas atuam na inibição da síntese proteica bacteriana, impedindo a associação do grupo aminoacil-tRNA com o sítio ribossômico específico (CHOPRA, 1994). As moléculas possuem uma alta afinidade por uma região da subunidade 30S ribossômica, mais especificadamente bases da porção 16S rRNA e proteínas S7 (SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996). A classe das tetraciclinas possui antimicrobianos com amplo espectro de ação, sendo muito eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bactérias intracelulares como clamídias e rickettsias, e protozoários parasitas (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Existem duas formas nas quais as bactérias podem adquirir resistência as tetraciclinas: através de mutações específicas no RNA ribossômico e por expressão de determinantes *tet* e *otr* (NGUYEN et al., 2014).

3.4 *Escherichia coli*

Em 1885, o pediatra alemão Theodor von Escherich isolou pela primeira vez uma bactéria nomeada *Bacterium coli commune*, de fezes de crianças com disenteria, que posteriormente seria denominada *Escherichia coli* (MÉRIC et al., 2016). *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae (Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales), que compõe a microbiota do trato gastrointestinal do homem e de outros animais de sangue quente, como mamíferos e aves. Grande parte das cepas de *E. coli* são comensais e conferem benefícios a seu hospedeiro, como a síntese de ácidos graxos e vitaminas (K e B), e proteção contra bactérias patogênicas por competição de sítios de colonização (PROCOP et al., 2016). Entretanto, existem cepas patogênicas capazes de causar doenças intestinais em humanos, como as *E. coli* Diarreiogênicas (DEC), e doenças em sítios extra-intestinais, como as *E. coli* patogênicas Extraintestinais (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em aves, *E. coli* patogênica para Aves (APEC – “*Avian Pathogenic E. coli*”) podem causar colibacilose, doença característica por apresentar quadros como celulite, pericardite, salpingite e septicemia (NAKAZATO, 2009).

Análises filogenéticas têm classificado as amostras de *E. coli* em 4 grupos, designados como grupos A, B1, B2 e D. Por meio da presença e ausência de determinados genes (*chuA*, *yjaA*) e um fragmento de DNA (TspE4.C2) é possível categorizar as cepas de *E. coli* (CLERMONT; BONACORSI; BIGEN, 2000). Cepas extraintestinais são distintas filogeneticamente de cepas intestinais. As cepas de ExPEC pertencem principalmente aos grupos B2, e em menor frequência, ao grupo D, enquanto as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (TENAILLON et al., 2010).

As cepas de DEC distribuíem-se pelos grupos B1, D e em menor frequência pelo grupo A (SANTOS et al., 2009).

Por ser comum entre os hospedeiros, *E. coli* torna-se um importante alvo em estudos epidemiológicos. O fato desta bactéria ser facilmente manipulada em laboratório, possuir um rápido crescimento e adquirir facilmente elementos genéticos móveis a tornam um excelente modelo de estudo (DONNENBERG, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Diversos trabalhos investigam a presença de *E. coli* patogênica ou resistente a antimicrobianos em diversas fontes animais, e tentam compreender suas relações e riscos em potencial à saúde humana (BLAAK et al., 2015; LAUBE et al., 2013; LAUBE et al., 2014; SMET et al., 2009).

3.5 Mecanismos de transferência de resistência aos antimicrobianos

Os animais podem abrigar bactérias comensais em sua microbiota, como *E. coli*, que apresentam genes de resistência (KRUSE; SORUM, 1994). Estes genes podem ser transmitidos a outras bactérias através de elementos genéticos móveis (MGEs – *Mobile Genetic Elements*) (SMET et al., 2009). Elementos genéticos móveis, como integrons, transposons, sequências de inserção e plasmídeos, constituem importantes vetores na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos em *E. coli* e outras bactérias (SCHLÜTER et al., 2007; PITOUT, 2012).

Integrons são elementos genéticos transponíveis associados a plasmídeos que reúnem genes ou cassetes de genes distintos. O gene chave do integron de classe 1 é o gene *intI*, que codifica uma recombinase, também chamada de integrase (NANDI et al., 2004). Esta integrase e o sítio de recombinação permitem a aquisição de trechos de DNA ou cassetes gênicos, no qual estão frequentemente associados à resistência (COCCHI et al., 2007). Esses cassetes gênicos possuem uma região conservada (*attC*) que interage com a integrase nos processos de inserção ou excisão. Particularmente, os cassetes gênicos não possuem promotor, mas quando inseridos no integron são expressos pelo promotor adjacente ao gene *intI* (NANDI et al., 2004).

Plasmídeos são moléculas de DNA extra-cromossomais capazes de se autorreplicar e estão ligados a disseminação de resistência aos antimicrobianos

através de transferência horizontal de gene (CARATTOLI, 2013). São capazes de conferir resistência a maioria das classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas e quinolonas (CARATTOLI, 2009). Cepas que apresentam plasmídeos que compartilham o mesmo *replicon* são incapazes permanecer de forma estável na mesma célula, fenômeno conhecido como incompatibilidade plasmidial (NOVACK, 1987).

Desde 2005, uma técnica chamada PBRT (PCR-Based Replicon Typing) foi elaborada para tipificar os plasmídeos (*Inc Group*) encontrados em membros de Enterobacteriaceae, organizando-os em famílias plasmidiais. Cerca de 18 famílias plasmidiais podem ser encontradas (IncHI1, IncHI2, IncI1, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncW, IncY, IncP, IncA/C, IncT, IncK, IncB/O, IncFrep e IncFIAs) (CARATTOLI et al, 2005).

3.6 *Escherichia coli* resistente aos antimicrobianos na produção de frangos de corte

Independente da forma pela qual a resistência é adquirida, o uso de agentes antimicrobianos cria condições ideais para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes (GUARDABASSI; KRAUSE, 2008). Atualmente, a resistência bacteriana é considerada uma ameaça mundial, devido a disseminação de genes de resistência entre bactérias patogênicas e comensais (LABRO; BRYSKIE, 2014). Animais de produção podem servir como reservatórios de tais bactérias, e seus genes podem ser transferidos as bactérias presentes na microbiota de humanos, por meio da cadeia alimentar (APATA, 2011; CARATTOLI, 2008; LAVILA et al., 2008). Entre os isolados de frangos de corte investigados para o perfil de resistência aos antimicrobianos está *E. coli*. A bactéria é considerada uma indicadora do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em Gram-negativas intestinais (DE JONG; STEPHAN; SILLEY, 2011). Estudos fenotípicos e genotípicos envolvendo *E. coli* são realizados com o propósito de monitorar a resistência à antimicrobianos que possuem grande relevância na medicina humana.

Desde a década de 90, membros da família Enterobacteriaceae produtores de ESBL e AmpC, como *E. coli*, tem emergido no mundo todo

(EWERS et al., 2012). Infecções causadas por cepas resistentes, como por exemplo *E. coli* produtora de ESBL, dificultam o tratamento e aumentam a morbidade e mortalidade entre os hospedeiros (DAVIES; DAVIES, 2010).

Um monitoramento longitudinal realizado em 2013 na Alemanha mostrou uma alta ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC na cadeia produtiva de frangos (LAUBE et al., 2013). Aproximadamente 85% dos isolados de *E. coli* apresentaram gene para ESBL/AmpC (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY}). Estas cepas foram isoladas de diversas fontes de todo o ambiente de produção (fezes, cama de aviário, solo), e foram detectadas em todos os três períodos investigados, durante a criação das aves. Na Holanda, um estudo semelhante detectou a presença de *E. coli* produtora de ESBL em granjas de frangos de corte (65%) e poedeiras (81%), isoladas de diversas fontes (água, poeira, solo, mosca doméstica) (BLAAK et al., 2015). Na Espanha, *E. coli* produtora de ESBL foi encontrada em moscas domésticas capturadas em granjas de frangos de corte (SOLÀ-GINES et al., 2014). Todas as cepas foram caracterizadas como multirresistentes e aproximadamente 50% abrigavam os genes *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M14} e *bla*_{CTX-M9}. Estes resultados mostram como *E. coli* produtora de ESBL está amplamente distribuída no ambiente de produção de frango.

A carne de frango é um produto que apresenta uma alta contaminação por *E. coli* produtora de ESBL, se comparada a outros tipos de carnes (FRIESE et al., 2013). Leverstein e colaboradores (2011) observaram que 94% dos isolados de *E. coli* de amostras de carne de frango possuíam o fenótipo para ESBL. Por meio de sequenciamento foram identificados seis genes de ESBL (*bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{TEM52}, *bla*_{TEM20}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-12}), dois destes (CTX-M1 e TEM52) localizados no plasmídeo Incl. Na Itália, 98% de *E. coli* foram positivas para genes ESBL/AmpC (GHODOUSI et al., 2015). Na Holanda, aproximadamente 80% das carnes de frango examinadas foram positivas para *E. coli* produtora de ESBL (OVERDEVEST et al., 2011).

No Brasil, Koga e colaboradores (2015) mostraram um aumento na frequência de *E. coli* resistente entre os anos de 2007 e 2013. *E. coli* produtora de ESBL não foram encontradas entre os isolados de 2007, ao passo que 65% das carcaças amostradas em 2013 foram positivas para o fenótipo. Cyoia e colaboradores (2019), verificaram que 97% de todas as *E. coli* produtoras de

EBSL isoladas apresentaram genes *bla*_{CTX-M}, sendo o mais frequente o gene *bla*_{CTX-M2}. Em 2008, um estudo inglês, examinando carnes de frango importadas identificou o gene *bla*_{CTX-M2} em *E. coli* isolada de frangos do Brasil (WARREN et al., 2008). Silva e Lincopan (2012) fizeram um levantamento das β -lactamases de espectro estendido no Brasil, e relataram que CTX-M2 tem sido o tipo de ESBL mais frequente no país.

E. coli resistente a outros antimicrobianos, além de β -lactâmicos, também pode ser observada na produção de frangos. Por mais de 20 anos, a fosfomicina-trometanol é utilizada na clínica humana para o tratamento de infecções do trato urinária (ITU) causadas por *E. coli* ou *E. faecalis*, em muitos países, como Japão, Espanha, Alemanha, França e Brasil (FALAGAS et al., 2008). Na medicina veterinária, a fosfomicina é utilizada em fazendas na Argentina, Brasil e América Central, principalmente para o tratamento de doenças infecciosas em frangos e suínos (PÉREZ; TAPIA; SORACI, 2014). Um trabalho recente mostrou a presença de cepas contendo o gene *fosA3* e *bla*_{CTX-M}, isoladas de carcaça de frango no sul do Brasil (CYOIA et al., 2019). A primeira detecção do gene *fosA3* associado a *E. coli* produtora de ESBL foi realizada no Japão em 2013, em três isolados de pessoas saudáveis. O gene *fosA3* estava localizado em três plasmídeos pertencendo a grupos de incompatibilidade diferentes (IncN, Inc1 e IncFII) (SATO et al., 2013).

O uso de colistina na produção animal, especialmente como promotores de crescimento, representa um risco a saúde pública. Estudos sugerem que o gene *mcr-1*, possa ser transferido aos humanos via cadeia alimentar (CARNEVALI et al., 2016; WANG et al., 2017). Na Argentina, Dominguez e colaboradores (2018) identificaram a presença do gene *mcr-1* em 75% de *E. coli* isolada de fezes de frangos de corte. Alguns transconjugantes apresentaram simultaneamente os genes *mcr-1* e *qnrB*, o que sugere que estejam localizados no mesmo plasmídeo.

3.7 Programas de monitoramento de resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se um sério problema de saúde pública. Os efeitos negativos da resistência aos

antimicrobianos são conhecidos no mundo todo. Nos Estados Unidos, ao menos 2 milhões de pessoas adquirem infecções por bactérias resistentes a cada ano (CDC, 2013). Aproximadamente 50.000 pessoas morrem por ano na Europa e nos Estados Unidos, em decorrência de infecções causadas por bactérias resistentes (O'NEIL, 2014). Para Van Boeckel e colaboradores (2015) um dos fatores que contribuem para a emergência de bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública, está no amplo uso de antimicrobianos na produção animal. Segundo levantamento realizado neste estudo, em 2010, cinco países (Estados Unidos, China, Brasil, Alemanha e Índia) consumiram cerca de 51% dos antimicrobianos utilizados na produção animal mundial. Com o uso excessivo de antimicrobianos na produção animal e o surgimento de bactérias resistentes, é clara a possibilidade desses microrganismos passarem para a microbiota humana através do consumo da carne. Assim, há uma redução na eficiência dos antimicrobianos durante a utilização em quadros de infecção, gerando uma grande preocupação a nível mundial (CHANTZIARAS et al., 2014; GARCIA-MIGURA et al., 2014; STANTON, 2013).

Tratar desta ameaça à saúde pública, requer programas eficazes de vigilância da resistência antimicrobiana. Diante deste fato, em maio de 2015, a 68ª Assembleia Mundial da Saúde endossou um plano global de combate a resistência aos antimicrobianos. Este plano ressalta a necessidade de uma abordagem nos termos do *One Health*, envolvendo vários setores globais, incluindo medicina humana e veterinária, agricultura, finanças e meio ambiente. O plano tem a colaboração de órgãos como a Organização de Alimentos e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization*) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – *World Organization for Animal Health*) (WHO, 2017).

Alguns programas já são realizados em diversas partes do mundo. O Programa Integrado Dinamarquês de Monitoramento e Pesquisa de Resistência Antimicrobiana (DANMAP - *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*) existe desde 1995 e tem como objetivo coletar dados de várias fontes e monitorar a ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de animais, alimentos e humanos (DANMAP, 2019). Entre 2013 e 2016 o consumo de antimicrobianos

veterinários reduziu 10% (equivalente a 12 toneladas) (DANMAP, 2017). Em 2015, houve uma diminuição significativa na prevalência de bactérias produtoras de ESBL isoladas de carne de frango, comparadas ao pico de ocorrência das cepas em 2011 (DANMAP, 2015).

Na Holanda, desde 2002 o uso de antimicrobianos na produção animal é publicado no relatório MARAN (*Monitoring of Antimicrobial Resistance and antibiotic usage in Animal in the Netherlands*). Desde 2009, o governo holandês lançou um programa para reduzir a resistência aos antimicrobianos (WUR, 2019). Em 2010, após a proibição do uso de ceftiofur em incubatórios, houve uma redução da ocorrência de bactérias resistentes a cefotaxima, passando de 18% (2010) para menos de 10% (2011) (MEVIUS, 2012). Entre os anos de 2009 e 2018 as vendas de antimicrobianos caíram aproximadamente 64% (WUR, 2019). Speksnijde e colaboradores (2015) relatam que a colaboração entre governo, profissionais veterinários e partes interessadas no setor pecuário, além de ações obrigatórias com metas, resultaram na diminuição do uso de antimicrobianos na produção animal. Essa redução no uso de antimicrobianos refletiu na diminuição significativa do número de bactérias resistentes. Segundo relatório de 2018, entre 2015 e 2016, a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC em frangos de corte reduziu de 56% para 32.6% (MARAN, 2018).

No Brasil, recentemente foi elaborado um Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), alinhado com os objetivos da WHO, FAO e OIE. O objetivo desse plano é garantir o tratamento e prevenção de doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes, acessíveis a todos que precisem e com qualidade garantida. O plano terá vigência de quatro anos (2018 a 2022), sendo avaliado anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Além disso, a fim de garantir a sustentabilidade do PAN-BR, o MAPA instituiu o Programa AgroPrevine, por meio da Instrução Normativa nº 41/2017, que visa fortalecer as ações de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos na produção animal, levando em conta o conceito de *One Health* (MAPA, 2019b).

Além dos programas nacionais instituídos, alguns programas possuem financiamento privado. A Vigilância Europeia de Susceptibilidade

Antimicrobiana em Animais (EASSA) é um programa de monitoramento da resistência em bactérias zoonóticas isoladas da produção de alimentos de origem animal. É um programa financiado por empresas farmacêuticas que está em operação desde 1998, e conta com mais de 25.000 isolados (DE JONG et al., 2014).

3.8 Conceito de *One Health* e a importância do monitoramento da resistência aos antimicrobianos

Cantas e Suer (2014) reforçam que a interação dinâmica entre humanos, animais e patógenos em um determinado ambiente faz parte de uma abordagem do conceito *One Health*. Os autores enfatizam o problema das doenças zoonóticas e apresentam formas de como estas podem ser transmitidas: (1) através de arranhões ou mordidas de animais, (2) rota oral fecal, através de produtos de origem animal contaminados e/ou preparados de forma inadequada, (3) exposição dos trabalhadores aos patógenos em fazendas (produtores, veterinários, etc.), (4) vetores como insetos (mosquitos, moscas), e (5) contaminação de água de consumo ou solo com dejetos e resíduos de animais.

Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), o *One Health* é uma abordagem colaborativa e transdisciplinar global, que possui o objetivo de promover a saúde na interface humana, animal e ambiental (CDC, 2019). Nos Estados Unidos, ao longo dos anos, a ocorrência de doenças vinculadas ao consumo de alimentos ou cadeia alimentar tem aumentado, mesmo com o melhoramento da segurança microbiológica aplicada na indústria (DOYLE et al., 2015). Técnicas como as de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Pontos Críticos de Controle e Análise de Perigos (PCCAP) aplicadas na indústria, e técnicas de Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Boas Práticas de Produção aplicadas na cadeia produtiva, são utilizadas em diversos países. Entretanto muitos surtos ligados aos alimentos ainda ocorrem e em algumas situações não são devidamente notificados por falta de um diagnóstico preciso, o que gera uma subestimação dos incidentes (KOLUMAM; DIKICI, 2013). Segundo Nandon e colaboradores (2017) cerca de uma a cada dez pessoas

fica doente durante o ano devido ao consumo de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos.

Mas, além da problemática disseminação de bactérias patogênicas e o intrínseco risco zoonótico associado, a questão da resistência aos antimicrobianos por esses microrganismos é outra questão a ser considerada dentro do conceito *One Health*. Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos tornou-se uma questão de extrema importância em todo mundo, por afetar de forma drástica a saúde pública. Em 2014, dados apontados por O'Neil, estimam que se não houver um controle da resistência aos antimicrobianos hoje, no ano de 2050, as mortes passarão de 700.000/ano para 10 milhões/ano, com custos e prejuízos no setor econômico mundial em torno de US\$100 trilhões de dólares (O'NEIL, 2014).

Landers e colaboradores (2015) sugerem que para compreender os impactos da resistência aos antimicrobianos devido ao uso dessas drogas na produção animal, é necessário considerar uma interação complexa entre o ambiente, as etapas de produção e processamento e os padrões de consumo humano. Berendonk e colaboradores (2015) fazem uma reflexão sobre a necessidade de pesquisas e opções de política e gerenciamento sobre o combate à resistência aos antimicrobianos no ambiente, como medida protetiva a saúde humana e animal. Os autores propõem que para avaliar a disseminação da resistência no meio ambiente e risco de transmissão aos humanos é necessário a padronização de testes em amostras ambientais e elaboração de um banco de dados que agregue informações ambientais e clínicas. Além disso, sugerem que um monitoramento a longo prazo seja realizado e que os dados não sejam providos de pesquisas esporádicas.

Dada a situação da resistência aos antimicrobianos e as questões sobre a interface da saúde humana, animal e ambiente, é importante ressaltar o papel do *One Health* na direção desse problema (LAMMIE; HUGHES. 2016).

4.0 REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal) Relatório Anual, 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em 19 de maio 2018.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANDRIOLE, V. T. The quinolones: past, present, and future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. 113-119, 2005.

APATA, D. F. The Emergence of Antibiotics Resistance and Utilization of Probiotics for Poultry Production. 2011.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BERENDONK, Thomas U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310, 2015.

BEZERRA, W. G. A., HORN, R. H., SILVA, I. N. G., TEIXEIRA, R. S. C., LOPES, E. S., ALBUQUERQUE, A. H., CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

BLAAK, H., HOEK, A. H. A. M., HAMIDJAJA, R. A., PLAATS, R. Q. J., HEER, L. K., HUSMAN, A. M. R., SCHETS, F. M. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0135402, 2015.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: a focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a025239, 2017.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CANTAS, L.; SUER, K. The important bacterial zoonoses in "One Health" concept. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 144, 2014.

CANTÓN, R., NOVAIS, A., VALVERDE, A., MACHADO, E., PEIXE, L., BAQUERO, F., COQUE, T. M. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, suppl. 1, p. 144 – 153, jan. 2008.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466 – 475, ago. 2006.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, 2013.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 117-123, 2008.

CARATTOLI, A., BERTINI, A., VILLA, L., FALBO, V., HOPKINS, K. L., THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219-228, 2005.

CARNEVALI, C., MORGANTI, M., SCALTRITI, E., BOLZONI, L., PONGOLINI, S., CASADEI, G. Occurrence of MCR-1 colistin-resistant *Salmonella* isolates recovered from human and animals in Italy, 2012-2015. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 01803-16, 2016.

CDC (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - US). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, 2013.

CDC (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - US). Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/>. Acesso em 1 de setembro de 2019.

CHANTZIARAS, I., BOYEN, F., CALLENS, B., DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 827–834, 2014.

CHIN, N. X., NEU, N. M., NEU, H. C. Synergy of fosfomicin with beta-lactam antibiotics against staphylococci and aerobic gram-negative bacilli. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 12, n. 12, p. 943-947, 1986.

CHOPRA, I. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 637, 1994.

CHOPRA, I., ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

COCCHI, S., GRASSELLI, E., GUTACKER, M., BENAGLI, C., CONVERT, M., PIFFARETTI, J.C. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 126-132, 2007.

CYOIA, P. S., KOGA, V. L., NISHIO, E. K., HOULE, S., DOIZOIS, C. M., BRITO, K. C. T., BRITO, B. G., NAKAZATO, G., KOBAYSAHI, R. K. T. Distribution of ExPEC virulence factors, *bla*_{CTX-M}, *fosA3*, and *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from commercialized chicken carcasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3254, 2019.

DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). Disponível em: <https://www.danmap.org>. Acesso em: 1 de setembro de 2019.

DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2015.

DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2017.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE JONG, A., SMET, A., LUDWIG, C., STEPHEN, B., DE GRAEF, E., VANROBAEYS, M., HAESEBROUCK, F. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008–2011). **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3-4, p. 298-306, 2014.

DE JONG, A.; STEPHAN, B.; SILLEY, P. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 239-245, 2011.

DECK, D. H., WINSTON, L. G. Antibióticos beta-lactâmicos e outros antibióticos ativos na parede e membrana celular. In: **Katzung, B. G., Trevor, A. J. Farmacologia Básica e Clínica**. 13° ed., p. 767-787. 2017.

DHILLON, R.H. P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1 - 11, abr. 2011.

DIERIKX, C., GOOT, J., FABRI, T., ESSEN-ZANDBERGEN, A., SMITH, H., MEVIUS, D. Extended-spectrum- β -lactamase-and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 60-67, 2013.

DIERIKX, C., GOOT, J., ESSEN-ZANDBERGEN, A., MEVIUS, D. J. Dynamics of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in broilers in the first week of life. **Veterinary Microbiology**, v. 222, p. 64-68, 2018.

DIXON, R. A.; CHOPRA, I. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 5, p. 781-788, 1986.

DOMINGUEZ, J. E., REDONDO, L. M., ESPINOSA, R. A. F., CEJAS, D., GUTKIND, G. O., CHANCANA, P. A., CONZA, J. A., MIYAKAWA, M. E. F. Simultaneous carriage of *mcr-1* and other antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* from poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1679, 2018.

DONNENBERG, M. *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis. **Academic Press**, 2° ed., p. 621, 2013.

DOYLE, M. P., ERICKSON, M. C., ALALI, W., CANNON, J., DENG, X., ORTEGA, Y., SMITH, M. A., ZHAO, T. The food industry's current and future role in preventing microbial foodborne illness within the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 252-259, 2015.

DUGGAR, Benjamin Minge. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 51, n. 2, p. 177-181, 1948.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA J.**, v. 9, 2011.

ESCHENBURG, S., PRIESTMAN, M., SCHÖNBRUNN, E. Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3757-3763, 2005.

EWERS, C.; BETHE, A.; SEMMLER, T.; GUENTHER, S.; WIELER L. H. 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, 2012.

FALAGAS, M. E., ATHANASAKI, F., VOULGARIS, G. L., TRIARIDES, N. A., VARDAKAS, K. Z. Resistance to fosfomicin: mechanisms, frequency and clinical consequences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2018.

FALAGAS, M. E., VOULOUMANOU, E. K., SAMONIS, G., VARDAKAS, K. Z. Fosfomicin. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 321-347, 2016.

FALAGAS, M. E., KASTORIS, A. C., KARAGEORGOPOULOS, D. E., RAFAILIDIS, P. I. Fosfomicin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 111-120, 2009.

FALAGAS, M. E., GIANNOPOULOS, K. P., KOKOLAKIS, G. N., RAFAILIDIS, P. I. Fosfomicin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 7, p. 1069-1077, 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). Biennial Report on Global Food Markets. 2019.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICAL DATABASE). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 1 de setembro de 2019.

FDA U. S (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. **Summary Report** 2017.

FDA U. S (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209. Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration, Rockville, MD. USA, 2013.

FINLAY, A. C., HOBBY, G. L., P'NA, S. Y., REGNA, P. P., ROUTIEN, J. B., SEELY, D. B., SHULL, G. M., SOBIN, B. A., SOLOMONS, I. A., VINSON, J. W., KANE, J. H. Terramycin, a new antibiotic. **Science (Washington)**, p. 85-7, 1950.

FRIESE, A., SCHULZ, J., LAUBE, H., SALVIATI, C., HARTUNG, J., ROESLER, U. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. **Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift**, v. 126, n. 3-4, p. 175-180, 2013.

GARCIA-MIGURA, L., HENDEIKSEN, R. S., FRAILE, L., AARESTRUP, F. M. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 1-9, 2014.

GHODOUSI, A., BONURA, C., DI NOTO, A. M., MAMMINA, C. Extended-spectrum β -lactamase, AmpC-producing, and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in retail broiler chicken meat, Italy. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 7, p. 619-625, 2015.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66-69, 2012.

GISKE, C. G. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 899-905, 2015.

GUARDABASSI, L., KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: Ames, I. A. **Guide to Antimicrobial Use in Animals**, p. 1-12, 2008.

HENDLIN, D., STAPLEY, E. O., JACKSON, M., WALLICK, H., MILLER, A. K., WOLF, F., J., MILLER, T. W., CHAIET, L., KAHAN, F. M., FOLTZ, E. L., WOODDRUFF, H. B., MATA, J. M., HERNANDEZ, S., MOCHALES, S. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. **Science**, v. 166, n. 3901, p. 122-123, 1969.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 9, p. a025320, 2016.

JACOBY, G. A. AmpC -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161 – 182, jan. 2009.

JEANNOT, K., BOLARD, A., PLESIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

KAMPRANIS, S. C., MAXWELL, A. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 25, p. 14416-14421, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

KOGA, V. L., MALUTA, R. P., SILVEIRA, W. D., RIBEIRO, R. A., HUNGRIA, M., VESPERO, EI. C., NAKAZATO, G., KOBAYASHI, R. K. T. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 174, 2019.

KOGA, V. L., SCANDORIEIRO, S., VESPERO, E. C., OBA, A., BRITO, B. G., BRITO, K. C. T., NAKAATO, G., KOBAYASHI, R. K. T. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

KOLUMAN, A.; DIKICI, A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 57-69, 2013.

KORB, A. Resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de frangos da região metropolitana de Curitiba e identificação de riscos à saúde humana. **Tese de Doutorado**. 2014.

KRUSE, H., SØRUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4015-4021, 1994.

LABRO, M., BRYSKIER, J. Antibacterial resistance: an emerging 'zoonosis'?. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 12, p. 1441-1461, 2014.

LAMMIE, S. L., HUGHES, J. M. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p. 287-312, 2016.

LANDERS, T. F., COHEN, B., WITTUM, T. E., LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.

LAPONOGOV, I. et al. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 667, 2009.

LAUBE, H., FRIESE, H., SALVIATI, C., GUERRA, B., RÖSLER, U. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 519-527, 2014.

LAUBE, H., FRIESE, A., SALVIATI, C., GUERRA, B., KÄSBOHRER, A., KREIENBROCK, L., RÖSLER, U. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4815-4820, 2013.

LAVILLA, S., GONZÁLEZ-LOPEZ, J. J., MIRÓ, E., DOMÍNGUEZ, A., LLAGOSTERA, M., BARTOLOMÉ, R. M., MIRELIS, B., NAVARRO, F., PRATS, G. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1244-1251, 2008.

LESHER, G. Y., FROELICH, E. J., GRUETT, M. D, BAILEY, J. H., BRUNDAGE, R. P. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A., DIERIKX, C. M., STUART, J. C., VOETS, G. M., MUNCKHOF, M. P., ESSEN-ZANDBERGEN, A., PLATTEEL, T., FLUIT, A. C., SANDE-BRUIJNSMA, N., SCHARINGA, J., BONTEN, M. J. M., MEVIUS, D. J. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 6, p. 873-880, 2011.

LI, J., NATION, R. L., TURNIDGE, J. D., MILNE, R. W., COULTHARD, K., RAYNES, C. R., PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 589-601, 2006.

LI, J., NATION, R. L., MILNE, R. W., TURNIDGE, J. D., COULTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 11-25, 2005.

LI, J., MILNE, R. W., NATION R. L., TURNIDGE, J. D., COULTHARD, K. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1364-1370, 2003.

LIM, L. M., LY, N., ANDERSON, D., YANG, J. C., MACANDER, L., JARKOWSKI III, A., FORREST, A., BULITTA, J. B., TSUJI, B. T. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 30, n. 12, p. 1279-1291, 2010.

LIU, Y. Y., WANG, Y., WALSH, T. R., YI, L. X., ZHANG, R., SPENCER, J., DOI, Y., TIAN, G., DONG, B., HUANG, X., YU, L. F., GU, D., REN, H., CHEN, X., LV, L., HE, D., ZHOU, H., LIANG, Z., LIU, J. H., SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 128, 2012.

MACNAIR, C. R., STOKES, J. M., CARFRAE, L. A., FIEBIG-COMUM, A. A., COOMBES, B. K., MULVEY, M. R., BROWN, E. D. Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 458, 2018.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTACIMENTO). Legislação – Alimentação Animal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-alimentacao-animal>. Acesso em: 31 de agosto de 2019. 2019a.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/agroprevine>. Acesso em: 7 de setembro de 2019. 2019b.

MARAN. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic usage in animals in the Netherland in 2017. 2018.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 797-799, 1998.

MÉRIC, G., HITCHINGS, M. D., PASCOE, B. SHEPPARD, S. K. From Escherich to the *Escherichia coli* genome. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 634-636, 2016.

MEVIUS, D. J. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2010/2011, 2012.

MICHALOPOULOS, A. S.; LIVADITIS, I. G.; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. e732-e739, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022 (PAN-BR). 2018.

MOFFATT, J. H., HARPER, M., HARRISON, P., HALE, J. D. F., VINOGRADOV, E., SEEMANN, T., HENRY, R., CRANE, B., MICHAEL, F. S., COX, A. D., ADLER, B., NATION, R. L., LI, J., BOYCE, J. D. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 4971-4977, 2010.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017.

NADON, C., WALLE, I. V., GERNER-SMIDT, P., CAMPOS, J., CHINEM, I., CONCEPCION-ACEVEDO, J., GILPIN, B., SMITH, A. M., KAM, K. M., PEREZ, E., TREES, E., KUBOTA, .K., TAKKINEM, J., NIELSEN, E. M., CARLETON, H. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 23, 2017.

NAKAZATO, G., CAMPOS, T. A., STEHLING, E. G., BROCCHI, M., SILVEIRA, W. D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

NANDI, S., MAURER, J. J., HOFACRE, C., SUMMERS, A. O. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7118-7122, 2004.

NARROD C., A., TIONGCO, M. Global poultry sector trends and external drivers of structural change. FAO, Rome. 2012.

NGUYEN, F., STAROSTA, A. L., ARENZ, S., SOHMEN, D., DONHOFER, A., WILSON, D. N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 559-575, 2014.

NOVICK, R. P. Plasmid incompatibility. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 381, 1987.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 1-16, 2014.

OLAITAN, A. O., MORAND, S., ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

OVERDEVEST, I., WILLEMSSEN, I., RIJNSBURGER, M., EUSTACE, A., XU, L., HAWKEY, P. HECK, M., SAVELKOUL, P., VANDENBROUCKE-GRAULS, C., ZWALUW, K., HUIJSDENS, X., KLUYTMANS, J. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1216, 2011.

PÉREZ, D. S.; TAPIA, M. O.; SORACI, A. L. Fosfomycin: Uses and potentialities in veterinary medicine. **Open Veterinary Journal**, v. 4, p. 26–43, 2014.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

POIREL, L., MADEC, J., LUPO, A., SCHINK, A., KIEFFER, N., NORDMANN, P., SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p., 2018.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 295-297, 2008.

PRESCOTT, J. F. Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, v. 3, p. 105-133, 2006.

PROCOP, G. W., CHURCH, D. L., HALL, G. S., JANDA, W. M., KONEMAN, E. W., SCHRECKENBERGER, P. C., WOODS, G. L. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7° ed., p. 213-315. 2016.

RAZ, R. Fosfomicin: an old—new antibiotic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, p. 4-7, 2012.

READING, C., COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 852-857, 1977.

REBELO, A. R., BORTOLAIA, V., KJELDGAARD, J. S., PEDERSON, S. K., LEEKITCHAROENPHON, P., HANSEN, I. H., GUERRA, B., MALORNY, B., BOROWIAK, M., HAMMERL, J. A., BATTISTI, A., FRANCO, A., ALBA, P., PERRIN-GUYOMARD, A., GRAINER, S. A., ESCOBAR, C. F., MALHOTRA-KUMAR, S., VILLA, L., CARATTOLI, A., HENDRIKSEN, R. A. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 6, 2018.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 3-4, p. 335-375, 1991.

REGULATION (EC) N° 1831/2003. European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Capítulo 2, Artigo 11. L 268: 29–43, 2003.

RIZZI, A. T. Mudanças tecnológicas e reestruturação da indústria agroalimentar: o caso da indústria de frangos no Brasil. 1993. 194fls. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

ROBINSON, T. P., WINT, G. R. W., CONCHEDDA, G., VAN BOECKEL, T. P., ERCOLI, V., PALAMARA, E., CINARDI, G., D'AIETTI, L., HAY, S. I., GILBERT, M. Mapping the global distribution of livestock. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e96084, 2014.

SALIU, E., VAHJEN, W., ZENTEK, J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 46-57, 2017.

SANTOS, M. A. C. et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p. 392-400, 2009.

SARMAH, A. K., MEYER, M. T., BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SATO, N., KAWAMURA, K., NAKANE, K., WACHINO, J., ARAKAWA, Y. First detection of fosfomicin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 6, p. 477-482, 2013.

SCHLÜTER, A., SZCZEPANOWSKI, R., PUHLER, A., TOP, E. M. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 449-477, 2007.

SCHNAPPINGER, D., HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 359-369, 1996.

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, 2012.

SINDIAVIPAR. Disponível em: <https://sindiavipar.com.br/>. Acesso em: 1 de setembro de 2019.

SMET, A., MARTEL, A., PERSONS, D., DEWULF, J., HEYNDRIKX, M., HERMAN, L., HAESBROUCK, F., BUTAYE, P. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology reviews**, v. 34, n. 3, p. 295-316, 2009.

SOLÀ-GINÉS, M., GONZÁLEZ-LOPEZ, J. J., CAMERON-VEAS, K., PIEDRA-CARRASCO, N., CERDÁ-CUÉLLAR, M., MIGURA-GARCIA, L. Houseflies (*Musca domestica*) as vectors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Spanish broiler farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3604-3611, 2014.

SPEKSNIJDER, D. C., MEVIUS, D. J., BRUSCHKE, C. J. M., WAGENAAR, J. A. Reduction of veterinary antimicrobial use in the Netherlands. The Dutch success model. **Zoonoses and public health**, v. 62, p. 79-87, 2015.

STANTON, T. B. A call for antibiotic alternatives research. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 111–113, 2013.

STOKSTAD, E. L. R., JUKES, T. H., PIERCE, J., PAGE, A. C. Jr, FRANKLIN, A. L. The multiple nature of the animal protein factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 647-654, 1949.

TIPPER, D. J., STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 54, n. 4, p. 1133, 1965.

TOOKE, C. L., HINCHLIFFE, P., BRAGGIONTON, E. C., COLENZO, C. K., HIRVONEN, V. H. A., TAKEBAYASHI, Y., SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, 2019.

VAN BOECKEL, T. P., BROWER, C., GILBERT, M., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., ROBINSON, T. P., TEILLANT, A., LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 5649–5654, 2015.

VAN PUYVELDE, S.; DEBORGGRAEVE, S.; JACOBS, J. Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 132–134, 2018.

VENKATESWARAN, P. S.; WU, H. C. Isolation and characterization of a phosphonomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 3, p. 935-944, 1972.

VIEIRA, N. M.; DIAS, R. S. Uma abordagem sistêmica da avicultura de corte na economia brasileira. In: NEVES, M. F.; BIALOSKORSKI, S.; SCARE, R. F. CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL. 2005

WANG, Y., ZHANG, R., LI, J., WU, Z., YIN, W., SCHWARZ, S., TYRRELL, J. M., ZHENG, Y., WANG, S., SHEN, Z., LIU, Z., LIU, J., LEI, L., LI, M., ZHANG, Q., WU, C., ZHANG, Q., WU, Y., QALSH, T. R. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 16260, 2017.

WARREN, R. E., ENSOR, V. W., O'NEIL, P. O., BUTLER, V., TAYLOR, J., NYE, K., HARVEY, M., LIVERMORE, D. M., WOODFORD, N., HAWKEY, P. M. 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, 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global action plan on antimicrobial resistance. 2015. 2017.

WUR (Wageningen University and Research). Disponível em: <https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/Bioveterinary-Research/In-the-spotlight/Antibiotic-resistance-2/MARAN-reports.htm>. Acesso em: 1 de setembro de 2019.

5.0 ARTIGO CIENTÍFICO

Todas as metodologias, resultados e discussões foram apresentados na forma de artigo científico. Este artigo foi submetido a revista internacional “*Applied and Environmental Microbiology*”, e tem como título: **Detection of ESBL/AmpC producing *E. coli* from different sources of poultry production in southern Brazil**

Detection of ESBL/AmpC producing *E. coli* from different sources of poultry production in southern Brazil

Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil,

Avian Health Laboratory & Technological if the Veterinary Research Institute Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

****Corresponding author:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, e-mail: kobayashirkt@uel.br

Key-words: Antimicrobial resistance, ESBL, *Escherichia coli*, Fosfomycin, Poultry, Public Health

Running Title: ESBL/AmpC-producing *E. coli* from poultry production

Abstract

ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* strains, among other Enterobacteriaceae are a major public health problem worldwide. The presence of these strains in poultry alerts us about the antimicrobials use in this production system, as well as instigate us about possible factors that influence the presence of these strains in the production chain. Thus, the aim of this work was to perform a longitudinal monitoring of ESBL-producing *E. coli* strains in poultry farms in southern Brazil and to point out possible critical points that may be reservoirs of these strains. Samples of poultry litter, cloacal swab, poultry feed, water and beetles (*Alphitobius* sp.) were collected in three distinct periods, at each farm investigated from the states of Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS). Phenotypic and genotypic tests were performed for characterization of resistant strains. A total of 117 strains were isolated and 78 (67%) were positive for ESBL production. The poultry litter presented ESBL positive strains in almost all three sampled periods, while the cloacal swab presented positive strains from the second sampling. ESBL strains were found to be 4.33 times more likely in poultry litter, and 612.47 times more likely in beetles. The predominant gene was *bla*_{CTX-M2} in about 56% of ESBL-producing *E. coli*. About 19 of 26 fosfomicin-resistant strains showed the *fosA3* gene, all of which also produced ESBL. Our data reveal that poultry litter is a critical point during poultry production, and that fosfomicin resistant strains were found, alerting to the use of this antimicrobial during production.

Importance

Extended spectrum β -lactamases (ESBL) and AmpC type β -lactamases are enzymes that confer resistance to various β -lactam antimicrobials and are often found in Enterobacteriaceae family members, such as *Escherichia coli*. Food-producing animals, such as poultry, have a high number of ESBL-producing Enterobacteriaceae due to selective pressure imposed by antimicrobials use. We believe that there are critical points in production chain that may be reservoir for these strains, helping their dissemination to subsequent flocks. Our results showed that poultry litter is an important source of ESBL-producing *E. coli* strains compared to other investigated sources, such as poultry, water and poultry feed. Therefore, management techniques optimization could greatly benefit the production chain and consequently public health. In addition, our data can contribute to the elaboration of a resistance monitoring program in Brazilian animal production.

Introduction

Antimicrobial resistance is one of the most alarming public health problems of recent years. According to O'Neil, at 2050, bacterial resistance could cause the deaths of about 10 million people per year. The widespread use of antimicrobial drugs, both in humans and animals (including livestock animals), has favored the selection and dissemination of bacterial resistance worldwide (World Health Organization, 2014).

Extended-spectrum β -lactamase enzymes (ESBL) and AmpC-like enzymes are among the known mechanisms of bacterial resistance, both mediated by plasmid genes (Ceccarelli et al., 2019), which can be achieved through the horizontal transfer of mobile genetic elements, not only in intestinal but also

extra-intestinal environments (Lazarus et al., 2014). Both ESBL and AmpC enzymes are capable of hydrolyzing various β -lactam antimicrobials such as cephalosporins and monobactams, increasing difficulty to treat these infections (Paterson; Bonomo, 2005; Bush; Fisher, 2011).

A priori, ESBL/AmpC-producing bacteria were detected in the human clinic (Smet et al., 2009; Ewers et al., 2012). However, several studies report the presence of these resistant strains in animals, whether domestic (Wieler et al., 2011; Bortolami et al., 2019), or production ones (Smet et al., 2009; Pitout; Laupland, 2008; Dierikx et al., 2013; Laube et al., 2013; Dominguez et al., 2018). The presence of these enzymes is found in Enterobacteriaceae Family members, such as *Escherichia coli*, which have often been isolated in livestock, especially in broiler production (Blanc et al., 2006; Carattoli, 2008; Li et al., 2015). Among the most relevant β -lactamases, TEM, SHV and CTX-M are the main enzymes present in *Escherichia coli* that colonize and infect poultry (Olsen et al., 2014).

Several plasmid groups, categorized as the inability of two plasmids belonging to the same Inc group to be propagated in the same cell, have resistance genes and can be found in *E. coli* (Datta; Hedges, 1971; Carattoli 2011). The *bla*_{CTX-M} (e.g. CTX-M15 and CTX-M55) and *bla*_{TEM} genes are associated with plasmids belonging to the IncF and IncI groups (Cantón; Coque, 2006; Carattoli, 2013).

Worldwide, ESBL-producing Enterobacteriaceae have emerged in farm animals in recent decades (Carattoli, 2008). The pressure exerted by the use of antimicrobials on animal production, particularly in broilers, leads to elimination

of sensitive strains and selects the most resistant strains (Saliu; Vahjen; Zentek, 2017). Although antimicrobial resistance is a natural phenomenon, the prevalence of ESBL-producing strains in broilers has increased after the use of antimicrobials in production (Dierikx et al., 2013). Another relevant finding regarding the use of antimicrobials in production is the presence of fosfomycin-resistant strains in poultry carcass (Cyoia et al., 2019). Fosfomycin is a drug approved in several countries for the treatment of urinary tract infections (UTI) in humans (Keating, 2013). Thus, the presence of fosfomycin-resistant strains in poultry indicates the use of antimicrobials during breeding and raises further concerns that involve public health safety.

Given this fact, the possibility that bacterial strains, especially ESBL/AmpC-producing *E. coli*, may reach the human population through the consumption of chicken meat is a public health concern because compared to other types of meat (pork and beef), chicken meat is highly contaminated with ESBL-producing bacteria (Friese et al., 2013). Koga et al. (2015) reported the presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* strains isolated from poultry carcasses in southern Brazil. Cyoia et al. (2019) demonstrated that ESBL-producing *E. coli* strains were capable of transferring genes encoding CTX-M enzymes to a human *E. coli* strain.

The presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in poultry carcasses leads us to believe that there are critical points in industrial poultry production where these strains can be found and selected by the use of antimicrobials. Thus, the aim of this study was to monitor ESBL/AmpC-producing *E. coli* in poultry

production, and to point out possible critical points that may be reservoirs of these strains.

Material and Methods

Farm Characterization. Monitoring was carried out between February 2016 and March 2018, in two states of southern Brazil. Five farms of Rio Grande do Sul (RS) state and three farms in the state of Paraná (PR) state were sampled. Each farm was monitored at three different periods: (1) first day of production (1-day-old restocking chicks); (2) between 20th and 25th days of production; (3) between 36th and 38th days (before slaughter). In addition to sampling, a questionnaire was applied to producers to obtain information regarding property characteristics, management and biosecurity. In the state of RS, the production system was characterized as manual. On average, the farmers restock around 15000 1-day-old chicks in the poultry houses, and the slaughtering period ranged from 38 to 45 days. The water comes from artesian wells and is chlorinated in a reservoir present in each poultry house. In general, the material used in the poultry litter is rice husk, and the same litter was used in up to five subsequent batches. None of the farms reported the treatment of poultry litter before reuse. The antimicrobials used in RS farms were Enrofloxacin, Halquinol and Virginiamycin. In the state of PR, the production system observed was automated (dark house system). The average restocking was approximately 25000 1-day-old chicks and the slaughtering period ranged from 38 to 42 days. Thus, like in RS farms, the water used in the bird drinkers was chlorinated. These farms were made of wood and the same poultry litter was reused without

undergoing treatment. The antimicrobials reported in PR farms were Norfloxacin, Ciprofloxacin and Fosfomycin.

Ethics Statement. This study was approved by the Animal Ethics Committee of State University of Londrina (CEUA/UEL) (processing number – 22867.2015.23).

Sampling in the farms. The sampling methodology performed in this study was based on the Laube et al. (2013) with some modifications. Each period, samples of poultry litter (boot swab), cloaca swab (20 randomly selected poultry), poultry feed (500 g) and water (500 mL) were collected. In Paraná state, samples of *Alphitobius* sp. (approximately 100 beetles), popularly known as "darkling beetle", were also collected from the farms. The poultry litter was collected using sterile boot swab by walking the entire house length in a "zigzag". The poultry feed was obtained directly from the reservoir, and the water was collected from the farm reservoir taps.

The collected samples were refrigerated (4 °C) and sent to the laboratory for processing on the same day. Twenty-five grams of feed were weighed and diluted in 225 mL of buffered peptone water (BPW), followed by manual homogenization (approximately ten minutes). The boot swab was soaked with BPW, followed by manual homogenization. The water was processed using the multi-tube method (Most Probable Number Method – MPN), using Lauril Triptose broth, Brilliant Green broth and EC broth (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). The beetles were processed following the protocol provided by Segabinazi et al. (2005). After preprocessing, all samples were plated on MacConkey agar (MC) (Neogen Corporaton, Lansing, Michigan,

United States) and cefotaxime-supplemented MacConkey agar (MC/CTX) at a concentration of 8 µg/ml to select possible positive ESBL/AmpC strains.

Isolation and identification of ESBL / AmpC producing *E. coli*. MC and MC/CTX plates were analyzed for growth of characteristic colonies for *E. coli*. The colonies grown in MC/CTX (possible ESBL/AmpC producing *E. coli*) were prioritized, where 1 to 5 colonies were collected for biochemical identification. In case of non growth in MC/CTX plates, 1 to 5 colonies of MC plates were collected. The colonies were submitted to biochemical identification using EPM (Toledo; Fontes; Trabulsi, 1982a; Ewing, 1986), MILi (Toledo; Fontes; Trabulsi, 1982b; Ewing, 1986) and Simmons Citrate (Merck, Darmstadt, Germany). *E. coli* positive colonies were then stored in Brain Heart Infusion broth (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) supplemented with 30% glycerol and stored at -20 °C and -80 °C for later phenotypic and genotypic characterization.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the standard disk diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Antimicrobials used in this study included several classes as β-lactams - 30 µg of cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepim (FEP), aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ), cefepim (FEP), aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ), imipenem (IPM), and 20/10 µg of amoxicillin-clavulanic acid (AMC); Quinolones - 5 µg of ciprofloxacin (CIP), 10 µg of norfloxacin (NOR) and enrofloxacin (ENR), and 30 µg of nalidixic acid (NAL); Sulfonamides - 1.25/23.75 µg of trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT); Tetracycline - 30 µg of tetracycline (TET); Aminoglycosides - 10 µg of gentamicin (GEN), Phenicol - 30 µg of chloramphenicol (CHL); Nitrofurans - 300 µg of nitrofurantoin (NIT);

Fosfomycins - 200 µg of fosfomicin (FOT) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, United Kingdom). All strains were confirmed for ESBL production by double-disk approximation test by Jalier et al. (1988). *E. coli* isolate ATCC 25922 was used as a quality control during antimicrobial susceptibility test. Results were interpreted based on the CLSI (2018) criteria.

DNA Template. The strains were grown in Luria Bertani broth (LB) (Difco R, Sparks, MD) at 37 °C for 24 h. After centrifugation, pellets from 1 mL of grown culture were resuspended in 200 µL of sterile water, boiled for 10 min and centrifuged at 12,000 $\times g$ for 6 min. The supernatant was used as DNA template for the PCR assays. For the ERIC-PCR assays and sequencing, the DNA samples were extracted using an extraction Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®).

Detection of ESBL/AmpC genes in *E. coli* strains. Previously described PCR method was used for detection of the following antimicrobials resistance genes: ESBL producer (*bla*_{CTX-M} groups - 1, 2, 8, 9 e 25; *bla*_{TEM}; and *bla*_{SHV}) (Arlet; Philippon, 1991; Woodford; Fagan; Ellington, 2005); AmpC type producer (*mox*, *fox*, *ebc*, *acc*, *dha* and *cit*) (Pérez-Pérez; Hanson, 2002).

Detection of other antimicrobial resistance genes. The presence of fosfomicin resistance (*fosA3*) and colistin resistance (*mcr-1*) were examined as described respectively by Sato et al. (2013), Liu et al. (2016).

Phylogenetic Analysis. All *E. coli* strains were assigned to phylogenetic groups A, B1, B2 or D, by PCR, according Clermont et al. (2000). Strains were grouped at following groups: group A (*chuA*⁻, *yjaA*⁻, and TspE4.C2⁻); group B1

(*chuA*⁻, *yjaA*⁺, TspE4.C2⁻); group B2 (*chuA*⁺, *yjaA*⁺, TspE4.C2⁻ or *chuA*⁺, *yjaA*⁺, TspE4.C2⁺); and group D (*chuA*⁺, *yjaA*⁻, TspE4.C2⁺).

Plasmid-Based Replicon Typing (PBRT). All isolates were characterized to Incompatibility Group (Inc Group) using PCR-Based Replicon Typing (PBRT) (Carattoli et al., 2005). Simplex-PCR were used to recognize eight incompatibility plasmids: FIA, FIB, FIC, FII, I1, HI1, HI2, N (Carattoli et al., 2005).

ERIC-PCR Analysis. A template DNA was used to amplify repetitive elements from bacterial isolates by PCR technique to generate DNA fingerprint patterns. Clonality of the isolates was determined by the homology relationship among fragments amplified by Entobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) according to Versalovic et al., (Versalovic; Koeth; Lupski, 1991). Gel analysis was carried out through BioNumerics software, version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Laten, Belgium). The similarities in amplicon profile were compared using a DICE coefficient at 1% tolerance and 0,5% optimization. A dendrogram was constructed with the unweighted-pair group method with arithmetic mean clustering method with a cut-off of 80% similarity (McLellan; Daniels; Salmore, 2003).

Statistical Analysis. The data obtained were analyzed using a logistic regression model, with a significance level set at $p < 0.05$, the statistical software R version 3.5.1. In general, the analysis was performed to verify if there is any significant trend between the isolates producing ESBL and their origin.

Results

Poultry farms samples. A total of 117 *E. coli* strains were isolated from eight poultry farms in two states. Fifth-eight strains were isolated from three PR farms, and 59 strains from five RS farms. **Table 1** shows the periods where *E. coli* was detected in each farm using MC/CTX. The poultry litter samples grown in MC/CTX almost all periods (1° to 3°) in both states, whereas only cloacal samples isolated from the second period grown in MC/CTX. ESBL-producing strains were also detected in poultry feed and beetle sample from PR state. Water samples showed no growth in MC/CTX.

ESBL-producing *E. coli* were confirmed in 49/58 (84%) and 29/59 (49%) isolates from PR and RS, respectively. **Figure 1** shows the distribution of ESBL-producing and non-ESBL-producing *E. coli* strains over the sampling periods. Among 117 samples, ESBL producing *E. coli* strains were detected in poultry litter almost all periods (OR 4.33, $p < 0.05$), indicating that the chance of ESBL isolation in poultry litter is 4.33 times higher than in other sources. The isolation profile of cloacal poultry strains revealed that ESBL-producing *E. coli* was also present on the second sampling period (OR 4.22, $p < 0.05$). There were no ESBL producing strains in water samples (OR 0, $p < 0.05$), whereas among the strains isolated from beetles all were characterized as ESBL producers from all poultry farms in PR state (OR 612.47, $p < 0.05$).

***E. coli* antimicrobial resistance.** The antimicrobial susceptibility test indicated that strains isolated from poultry farms presented a high frequency of antimicrobial resistance, with 90% and 73% of strains from PR and RS, respectively, being considered multidrug resistant (MDR). The strains that

showed resistant to three or more classes of antibiotics were characterized as multidrug resistant (MDR), (**Tables 2 and 3**).

In PR state, most isolates were resistant to cefotaxime (85%), nalidixic acid (85%), cefepime (81%), tetracycline (79%), trimethoprim-sulfamethoxazole (78%), ceftazidime (74%), enrofloxacin (66%), ciprofloxacin and norfloxacin (55% each). Most isolates from RS were resistant to gentamicin (70%), tetracycline (63%), cefotaxime (58%), aztreonam (56%), nalidixic acid (54%) and cefepime (51%), presenting a diferente resistance profile from PR ones.

The frequency of resistance observed for fosfomicin in PR and RS strains was 40% and 5%, respectively. In both states, no imipenem resistant *E. coli* strain was found. ESBL-producing *E. coli* was found to be resistant to a higher number of antimicrobials (except imipenem) compared to non-ESBL-producing *E. coli* ($p < 0.05$) (**Figure 2**).

Detection of ESBL/AmpC, *fosA3* and *mcr-1* genes. PCR identified ESBL genes in 103/117 (88%) strains isolated from poultry farms (**Tables 2 and 3**). About 77/117 (66%) of the ESBL-producing *E. coli* strains harbored the ESBL genes investigated. In these strains the genes *bla*_{CTX-M2} (56%), *bla*_{CTX-M1} (39%), *bla*_{TEM} (32%), *bla*_{CTX-M8} (13%) were detected. The only AmpC gene detected was *cit* (13%). The *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M25} and *bla*_{SHV} genes were not detected, and one ESBL-producing strains carried none of the investigated genes. The CTX-M55 enzyme was identified in 100% of positive isolates for *bla*_{CTX-M1} gene.

Of the 26 fosfomicin resistant *E. coli* strains characteristic in the disc diffusion test, 19 (73%) harbored the *fosA3* gene, and all had ESBL phenotypes features. These *fosA3* positive strains were isolated from all PR farms that used

fosfomycin in production. Three fosfomycin resistant strains were isolated in RS and none of them presented *fosA3* gene. The *mcr-1* gene was detected in only one isolate (EcRS60) from RS. Among the ESBL-producing strains, 19 combinations between resistance genes detected were observed and, most of them are distributed among poultry and poultry litter isolates (**Table 4**). The *fosA3* gene was found in 19 strains and 18 of them were also harboring the *bla_{CTX-M1}* gene (OR 17.92, $p < 0.05$).

Inc group plasmid. The tables 2 and 3 show the results obtained from strains submitted to the PBRT technique. Replicons were detected in 97/117 (83%) isolates, and the inc typing showed the presence of FIB (n = 89; 76%), I1 (n = 37; 32%), HI2 (n = 7; 6%), FIA (n = 5 each; 4%), FIB (n = 5 each; 4%) and N (n = 4; 3%). The presence of HI1 and FII groups was not detected, and 19 strains were negative for all replicons tested. The most frequent replicons among ESBL-producing samples were FIB (71%) and I1 (36%).

Phylogenetic group and ERIC-PCR analysis. All strains were assigned into four main phylogenetic groups as described by Clermont et al. (2000). Most strains belong to phylogenetic group D (n = 54; 46%), following by group B1 (n = 28; 24%), group A (n = 27; 23%) and group B2 (n = 8; 7%) (**Table 5**). The ERIC-PCR analysis showed 16 small clusters in PR state and 15 clusters in RS state samples, whereas 19 and 17 singletons remained, respectively (**Figure 3 and 4**).

Discussion

The results reveal a high occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in poultry farms from southern Brazil. Interestingly, positive strains for this

phenotype were found in poultry litter in all sampled periods, as also observed by Laube et al. (2013). However, in poultry, ESBL-producing *E. coli* strains were detected only on the second and third sampling periods. The chance of ESBL-producing *E. coli* occurrence in poultry litter was approximately four times (OR 4.33) higher compared to the other sources analyzed. Thus, these data indicate that poultry litter can be a risk factor for dissemination of ESBL-producing *E. coli* on poultry houses, including the colonization of poultry, since cloacal swab of 1-day-old chicks showed low frequency of ESBL-producing *E. coli*. In addition, we put away the possibility that water (OR 0) and poultry feed (OR 0.37) are sources of these strains, given the isolation results.

Beyond the poultry litter, in our study, all *E. coli* strains isolated from beetle in PR state were positive for ESBL production (OR 612.47). These insects are omnivorous scavengers that feed on faecal matter and debris, therefore are commonly found in material such as poultry litter (Axtell, 1999). In addition, they are able to survive adverse conditions and often to endure within poultry houses over several flocks (Crippen; Sheffield, 2006). Many insects that inhabit the poultry houses can be carriers or reservoirs of MDR bacteria. Studies such as carried out (Blaak et al., 2014; Solà-Ginés et al., 2015), showed the presence of ESBL-producing *E. coli* in flies isolated from poultry farms. In our study, all *E. coli* strains isolated from beetle were positive for ESBL production. Thus, proper disinfection of poultry houses is an important key point in reducing MDR strains. Cleaning and disinfection practices are essential for decreasing the risk of ESBL-producing *E. coli* spreading to next flocks (Mo et al., 2016). Another biosecurity measure in poultry production is processing the poultry litter by composting. The composting process is a widely used method to make organic

waste safe prior to use (Wilkinson et al., 2011). Composting implies a reduction in the volume of organic waste and considerably reduces the number of pathogenic microorganisms (Bernal; Albuquerque; Moral, 2009). Gazal et al. (2015) analyzed poultry litter after the composting process and observed that few isolates (6.3%) had virulence genes from Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC), besides being susceptible to a large number of antimicrobials. Therefore, it is suggested that the practice of composting is a good alternative to eliminate possible multiresistant strains.

E. coli strains found in water samples were negative for ESBL production. The fact that the water from all poultry houses is chlorinated excludes the possibility of being a source of ESBL-producing *E. coli*.

The frequency of MDR strains presented in this paper is worrying. In addition, many strains have been detected as producing ESBL. Similar resistance profile have been detected in *E. coli* strains isolated from poultry farms in Italy (Ghodousi et al., 2015) and in Germany (Laube et al., 2013). Cyoia et al. (2019) detected multiresistant strains in 80% of poultry carcasses PR and RS states. Moreover, 30% of these strains were characterized as ESBL producers. Poultry-derived products are considered the main sources of ESBL-producing bacteria among all animal products due to high contamination (Saliu; Vahjen; Zentek, 2017). In Brazil, since 1998, many antimicrobial agents used as growth promoters are prohibited (MAPA, 2003, 2009), however, some antimicrobials are used for treatment or as a prophylactic measure. It was found that enrofloxacin was used during poultry production in both states, and

particularly the use of ciprofloxacin and norfloxacin in the investigated farms of PR were reported.

Currently, resistance to 3^o extended-generation cephalosporins induced by extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production represents a major public health problem (CDC, 2015; Blaak et al., 2015). In veterinary medicine these enzymes are very relevant as they confer resistance to various antimicrobials released for use, such as penicillins, aminopenicillins and cephalosporins such as ceftiofur (Poirel et al., 2018). In this study, 103/117 (88%) *E. coli* isolates contained *bla* genes (CTX-M1, 2 and 8 groups, and TEM). About 66% were confirmed as ESBL-producing, and the majority presented *bla*_{CTX-M2} (56%) gene, following *bla*_{CTX-M1} (39%), *bla*_{TEM} (32%) and *bla*_{CTX-M8} (13%). These data corroborate the description made by Silva and Lincopan (2012) about the ESBL genes epidemiology in Brazilian territory, especially in animal production.

Our results showed that some strains (EcPR33, EcPR34, EcPR35, EcRS1, EcRS2, EcRS3, EcRS4, EcRS37, EcRS39, EcRS40, EcRS50, EcRS51, EcRS58) were not positive in the phenotypic test for ESBL production. This results corroborates with Poirel, Kämpfer and Nordmann (2002) who suggest that enterobacteria may present the genes encoding for ESBL production, however not always detectable in disk diffusion antibiogram tests. One way to acquire ESBL-encoding genes, especially from the CTX-M group, is through interaction with environmental bacteria (Galán et al., 2013), such as those of the *Kluyvera* genus, which may not express such enzymes but act as a reservoir of ESBL genes for other strains, such as *E. coli* (Poirel; Kämpfer; Nordmann, 2002).

The selective pressure of bacteria exposed to antimicrobials in poultry farming leads to the death of sensitive strains but also selects the resistant ones (Poole, 2012; Saliu; Vahjen; Zentek, 2017). In addition, resistances to other antimicrobial classes can lead to co-selection and stronger promoters can increase the expression of ESBL genes (Gniadkowski, 2008).

About 26 strains in our study were fosfomycin resistant in the antibiogram test, and 73% harbored the *fosA3* gene. Fosfomycin is a bactericidal antimicrobial that inhibits peptide glycan synthesis, being widely used in human clinical practice to treat urinary tract infections (UTI) (Falagas, 2016). Notably, all strains positive for *fosA3* gene were also characterized as ESBL-producing. The odds ratio of finding *fosA3* gene is 17 times higher in strains that present the *bla*_{CTX-M1} gene. The *fosA3* gene was found in isolates from properties that used fosfomycin during poultry production in PR state. Sato et al. (2013) suggest that ESBL-producing strains that harbor the *bla*_{CTX-M} gene-associated with *fosA3* gene (specially CTX-M55 enzyme) naturally reside in the intestinal microbiota of individuals in clinical and veterinary settings. Thus, the use of fosfomycin in Brazil's poultry production may lead to the co-selection of ESBL-producing strains.

This is the first report of positive strains for the *fosA3* gene isolated from poultry production in southern Brazil. These results show the need for application of monitoring systems that investigate and understand the spread of antimicrobial resistance in animal production. Brazil is the second largest producer of poultry meat and leader in exportations in the world (ABPA, 2018).

Therefore, Brazil's production has great relevance in the world poultry scenario and, consequently, impacts public health through the food chain.

ERIC-PCR analysis between PR and RS strains showed a number of small clusters in both states. These findings demonstrate a high heterogeneity among *E. coli* strains isolated in this study. This results demonstrates that the problem of ESBL-producing *E. coli* strains during poultry production in southern Brazil is not the result of MDR clones expansion. Ghodousi et al. (2015) presented similar data regarding the analysis of ESBL-producing *E. coli* strains isolated from poultry farms in Italy. In general, the spread of ESBL genes among strains isolated from animals is carried out by horizontal gene transfer (Poirel et al., 2018). Thus, the large number of clusters associated with the great genetic diversity presented in our study suggest that the dissemination of resistance genes is due to horizontal transfer through conjugative plasmids.

IncFIB (n = 89; 76%), following IncI1 (N = 37, 32%) were the dominants replicon types in our samples. Several plasmid families carry ESBL/AmpC genes in ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae (Carattoli, 2009), which IncF, IncI and IncK types are frequently found (Liebana et al., 2012). Our results corroborate with other studies that investigated the presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* strains in poultry (Leverstein et al., 2011; Mnif et al., 2012).

For some years, the concept of One Health has been presented as a way to raise awareness about the relationship between human, animal and environmental health (Kahn, 2011). This approach is considered by international organizations, such as the World Health Organization, as an important element in disease control and prevention (Lerner; Berg, 2015).

However, this awareness should not only be limited to the control and prevention of pathogens, but should also address aspects of antimicrobial resistance. Lammie and Hughes (2016) suggest that due to the challenge presented by antimicrobial resistance and its relationship to the interface of human, animal and environmental health, it is essential to include this issue in the One Health approach.

In summary, the use of antimicrobials in poultry production has a great influence on the selection of multiresistant bacteria. The large number of multiresistant bacteria in animal foods severely implies public health as well as the national productive sector. Therefore, we believe that a longitudinal monitoring program in poultry production should be implemented in order to rise awareness about the use of antimicrobials. The rational use of the antimicrobials and other alternatives should be explored. Therefore, the improvement in management techniques, as poultry litter treatment, may consequently assist in decreasing of MDR strains in poultry farms, once this study demonstrated that the poultry litter is an important risk factor. These measures can optimize the production and preservation of animal and human health in long term.

Acknowledgements

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), who enabled the execution of this study.

Acknowledges to PhD Benito Guimarães de Brito and PhD Kelly Cristina Taglari de Brito from Avian Health Laboratory & Technological if the Veterinary

Research Institute Desidério Finamor (IPVDF) for their contributions to this study.

We thank PhD. Mariangela Hungria da Cunha and PhD. Renan Augusto Ribeiro from Soil Biotechnology Laboratory at EMBRAPA for helping with analysis in Bionumerics. We thank also PhD. Silvia Helena Sofia and MSc. Caroline Apolinário da Silva from Genetics and Animal Ecology Laboratory (LAGEA) at State University of Londrina (UEL) for help in sequencing.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. This work also was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – Process 433656/2018-2 Call MCTIC/CNPq 28/2018. This funding bodies have the role of pay the scholarships to students and pay the consumption materials used in this study. Additional support was provided by the Bill and Melinda Gates Foundation's Grand Challenges Explorations Brazil – New Approches to characterize the global burden of antimicrobial resistance (number OPP1193112).

None of these funding bodies had any in role in the desing of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Transparency declaration

All authors declare to have no conflicts of interest.

References

Arlet, G., Philippon, A. 1991. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiology Letters*, 82(1), 19-25.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). 2018. Annual Report of Brazilian Poultry Association. Brazilian Poultry Union, São Paulo, Brazil.

Axtell, R. C. 1999. Poultry integrated pest management: status and future. *Integrated pest management reviews*, 4(1), 53-73.

Bedenić, B., Randegger, C., Stobberingh, E., Hächler, H. 2001. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(7), 505-508.

Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444-5453.

Blaak, H., Hamidjaja, R. A., van Hoek, A. H., de Heer, L., de Roda Husman, A. M., Schets, F. M. 2014. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 239-246.

Blaak, H., van Hoek, A. H., Hamidjaja, R. A., van der Plaats, R. Q., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A. M., Schets, F. M. 2015. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. *PloS one*, 10(8), e0135402.

Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., Navarro, F., Cortés, P., Llagostera, M. 2006. ESBL-and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4), 299-304.

Bortolami, A., Zendri, F., Maciucă, E. I., Wattret, A., Ellis, C., Schmidt, V., Pinchbeck, G., Timofte, D. 2019. Diversity, Virulence, and Clinical Significance of Extended-Spectrum β -Lactamase-and pAmpC-Producing *Escherichia coli* From Companion Animals. *Frontiers in microbiology*, 10.

Brasil, Ministério da Agricultura (MAPA). (2003). "Pecuária e Abastecimento" in 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. Instrução Normativa (Portuguese). Available online at: <http://www.agricultura.gov.br/arqeditor/file/CRC/IN%20092003%20%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos>

Brasil, Ministério da Agricultura (MAPA). (2009). "Pecuária e Abastecimento" in Regulamento Técnico Para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. Instrução Normativa 26, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Brasília (Portuguese). Available online at: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action>

Bush, K., Fisher, J. F. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 65, 455-478.

Cantón, R., Coque, T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466-475.

Carattoli, A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 117-123.

Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227-2238.

Carattoli, A. 2011. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654-658.

Carattoli, A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298-304.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219-228.

Ceccarelli, D., Kant, A., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Hordijk, J., Wit, B., Mevius, D. J. Veldman, K. T. 2019. Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended spectrum cephalosporin's in commensal *Escherichia coli* from Dutch livestock in 2007-2017. *Frontiers in Microbiology*, 10, 76.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta: CDC.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), 4555-4558.

CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement CLSI Document M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 28th ed.

Crippen, T. L., Sheffield, C. 2006. External surface disinfection of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Medical Entomology*, *43*(5), 916-923.

Cyoia, P. S., Koga, V. L., Nishio, E. K., Houle, S., Dozois, C. M., de Brito, K. C. T., Brito, B. G., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. T. 2019. Distribution of ExPEC virulence factors, *bla*CTX-M, *fos*A3, and *mcr*-1 in *Escherichia coli* isolated from commercialized chicken carcasses. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3254.

Datta, N., & Hedges, R. W. 1971. Compatibility groups among *fi*- R factors. *Nature*, *234*(5326), 222.

Dierikx, C. M., van der Goot, J. A., Smith, H. E., Kant, A., Mevius, D. J. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PloS one*, *8*(11), e79005.

Dominguez, J. E., Redondo, L. M., Figueroa Espinosa, R. A., Cejas, D., Gutkind, G. O., Chacana, P. A., Di Conza, J. A., Fernandez Miyakawa, M. E. 2018. Simultaneous carriage of *mcr*-1 and other antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* from poultry. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1679.

Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L. H. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 646-655.

Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Company, New York.

Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G., Vardakas, K. Z. 2016. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 321-347.

Friese, A., Schulz, J., Laube, H., Hartung, J., Roesler, U. 2013. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 126(3-4), 175-180.

Galán, J. C., González-Candelas, F., Rolain, J. M., Cantón, R. 2013. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Frontiers in Microbiology*, 4, 9.

Gazal, L. E. S., Puño-Sarmiento, J. J., Medeiros, L. P., Cyويا, P. S., da Silveira, W. D., Kobayashi, R. K., Nakazato, G. 2015. Presence of pathogenicity islands and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in isolates from avian organic fertilizer. *Poultry Science*, 94(12), 3025-3033.

Ghodousi, A., Bonura, C., Di Noto, A. M., Mammina, C. 2015. Extended-spectrum β -lactamase, AmpC-producing, and fluoroquinolone-resistant

Escherichia coli in retail broiler chicken meat, Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(7), 619-625.

Gniadkowski, M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 11-32.

Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.

Kahn, L. H. 2011. The need for one health degree programs. *Infection ecology & epidemiology*, 1(1), 7919.

Keating, G. M. 2013. Fosfomicin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs*, 73(17), 1951-1966.

Koga, V. L., Rodrigues, G. R., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., de Brito, B. G., Brito, K. C. T., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. 2015. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 479-485.

Lammie, S. L., Hughes, J. M. 2016. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 287-312.

Laube, H., Friese, A., Von Salviati, C., Guerra, B., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U. 2013. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-

lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Applied and Environmental Microbiology* 79(16), 4815-4820.

Lazarus, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L., Rogers, B. A. 2014. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clinical Infectious Diseases*, 60(3), 439-452.

Lerner, H., Berg, C. 2015. The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 25300.

Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., Van Den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A. C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M. J. M., Mevius, D. J. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6), 873-880.

Li, Y., Chen, L., Wu, X., Huo, S. 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science*, 94(4), 601-611.

Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A. P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C., Threlfall, J. 2012. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infectious Diseases*, 56(7), 1030-1037.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.

McLellan, S. L., Daniels, A. D., Salmore, A. K. 2003. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2587-2594.

Mnif, B., Ktari, S., Rhimi, F. M., Hammami, A. 2012. Extensive dissemination of CTX-M-1-and CMY-2-producing *Escherichia coli* in poultry farms in Tunisia. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6), 407-413.

Mo, S. S., Kristoffersen, A. B., Sunde, M., Nødtvedt, A., & Norström, M. 2016. Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 130, 112-118.

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance. *Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*.

Olsen, R. H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B., Christensen, H. 2014. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Pathology*, 43(3), 199-208.

Paterson, D. L., Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.

- Pérez-Pérez, F. J., Hanson, N. D. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2153-2162.
- Pitout, J. D., Laupland, K. B. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159-166.
- Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 4038-4040.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4).
- Poole, K. 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069-2089.
- Saliu, E. M., Vahjen, W., & Zentek, J. 2017. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 46-57.
- Sato, N., Kawamura, K., Nakane, K., Wachino, J. I., Arakawa, Y. 2013. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microbial Drug Resistance*, 19(6), 477-482.

Segabinazi, S. D., Flôres, M. L., da Silva Barcelos, A., Jacobsen, G., Eltz, R. D. 2005. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(1), 51-55.

Silva, K. C. D., Lincopan, N. 2012. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 48(2), 91-99.

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P. 2009. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 295-316.

Solà-Ginés, M., González-López, J. J., Cameron-Veas, K., Piedra-Carrasco, N., Cerdà-Cuellar, M., Migura-Garcia, L. 2015. Houseflies (*Musca domestica*) as vectors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Spanish broiler farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3604-3611.

Toledo, M. R. F., Fontes, C. F., Trabulsi, L. R. 1982a. EPM-A modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase. *Revista De Microbiologia*.

Toledo, M. R. F., Fontes, C. F., Trabulsi, L. R. 1982b. MILi-a medium for detection of motility, indole and lysine decarboxylase. *Revista de Microbiologia*, v. 13, n. 3, p. 230-235.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831.

Wieler, L. H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lübke-Becker, A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 635-641.

Wilkinson, K. G., Tee, E., Tomkins, R. B., Hepworth, G., Premier, R. 2011. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. *Poultry Science*, 90(1), 10-18.

Woodford, N., Fagan, E. J., Ellington, M. J. 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 154-155.

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization.

Figure legends

Figure 1. Distribution of ESBL-producing and non-ESBL-producing *E. coli* during the sampling periods

Figure 2. Resistance of ESBL-producing and non-ESBL-producing *E. coli* strains isolated from poultry farms in southern Brazil. There were significant differences between ESBL-producing and non-producing strains ($p < 0.05$), except for nitrofurantoin and imipenem (all isolates were sensitive).

Figure 3. ERIC-PCR dendrogram of 58 *E. coli* strains isolated from PR poultry farms

Figure 4. ERIC-PCR dendrogram of 59 *E. coli* strains isolated from RS poultry farms

Tables

Table 1. Detection of ESBL-producing *E. coli* isolated in MC/CTX agar of sampling from farms in PR e RS.

Table 2. Phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* strains isolated from poultry farms in Paraná.

Table 3. Phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* strains isolated from poultry farms in Rio Grande do Sul.

Table 4. Distribution of ESBL-producing *E. coli* strains according to combination genes and sources in PR and RS states.

Table 5. Phylogenetic distribution of 78 ESBL producing *E. coli* strains and 39 non-ESBL-producing *E. coli* strains according to isolate source.

Tables

Table 1. Detection of ESBL-producing *E. coli* isolated in MC/CTX agar of sampling from farms in PR e RS.

Source of <i>E. coli</i>	PR farms									RS farms																
	Farm 1			Farm 2			Farm 3			Farm 4			Farm 5			Farm 6			Farm 7			Farm 8				
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°		
Poultry Litter	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
Poultry	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Poultry Feed	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beetle	+	-	+	-	+	+	-	+	+	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – Not Sampling

Table 2. Phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* strains isolated from poultry farms in Paraná.

Strain	Source	Farm	Period	ESBL/AmpC genes	Inc. Group	Phylogenetic group	Antimicrobial resistance	mcr-1 gene	fosA3 gene
EcPR01	Bedding	1	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	B1	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – SXT – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR02	Bedding	1	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	B1	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – NIT – SXT – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR03	Bedding	2	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	D	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – GEN – NAL	-	-
EcPR04	Bedding	2	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	A	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – CHL – STX – GEN – NAL	-	-
EcPR05	Beetle	1	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	-	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – SXT – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR06	Beetle	1	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – SXT – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR07	Bedding	1	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – TET – NAL	-	-
EcPR08	Bedding	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – TET – NAL	-	-
EcPR09	Bedding	1	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – TET – NAL – FOX	-	-
EcPR10	Bedding	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	FIB - FIC	A	FEP – CTX – ENR – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR11	Feed	1	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	I1	D	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – NIT – STX – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR12	Beetle	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	I1	B1	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR13	Beetle	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 – H2 – FIB	D	ATM – FEP – CTX – ENR – STX – TET – NAL	-	-
EcPR14	Bedding	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB – N	A	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR15	Bedding	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB – N	B1	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR16	Bedding	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB – N	A	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR17	Beetle	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 - FIB	B2	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – NIT – TET – NAL	-	-
EcPR18	Beetle	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	FIB	B1	AMC – ATM – FEP – CTX – CHL – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR19	Beetle	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	I1 - FIB	D	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP –	-	-

EcPR20	Poultry	1	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	N	A	CHL – STX – FOT – TET – NAL AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – NAL	-	-
EcPR21	Poultry	1	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>cit</i>	FIA – FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – GEN – NAL – FOX	-	+
EcPR22	Poultry	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	B1	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – NIT – STX – FOT – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR23	Poultry	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	I1	B1	ATM – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR24**	Water	1	3°	-	FIB	B1	NAL	-	-
EcPR25**	Water	1	3°	-	I1 – FIB	B1	NAL	-	-
EcPR26	Feed	2	2°	-	-	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR27	Feed	2	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	I1	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – STX – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR28	Poultry	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	D	CTX – ENR – NOR – CIP – FOT – TET – NAL	-	+
EcPR29	Poultry	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	I1 – FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR30	Poultry	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	-	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – NIT – STX – FOT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR31	Poultry	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	N	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – NIT – STX – FOT – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR32	Bedding	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B1	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – FOT – SXT – TET – GEN – NAL	-	+
EcPR33**	Bedding	3	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B2	STX – GEN	-	-
EcPR34**	Bedding	3	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B2	STX – GEN	-	-
EcPR35**	Bedding	3	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B2	STX – GEN	-	-
EcPR37	Bedding	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 – HI2 – FIB	B1	FEP – CTX – NIT – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR38**	Bedding	3	2°	-	FIA – FIB	D	ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR39	Poultry	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIA – FIB	D	AMC – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcPR40	Poultry	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIA – FIB	D	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR41	Poultry	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	ATM – FEP – CTX – TET – GEN – NAL	-	-
EcPR42	Bedding	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	B1	ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN	-	-
EcPR43	Feed	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	FIB	B1	ATM – FEP – CTX – STX – TET – GEN	-	-
EcPR44	Beetle	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	FIB	B1	FEP – CTX – STX – TET – GEN	-	-
EcPR45	Bedding	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	A	ATM – FEP – CTX – STX – TET – GEN – NAL	-	-

EcPR46**	Bedding	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	A	GEN - NAL	-	-
EcPR47	Poultry	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1	D	FEP - CTX - ENR - NOR - CIP - STX - GEN - NAL	-	-
EcPR48	Poultry	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1	D	ATM - FEP - CTX - ENR - CHL - STX - NAL	-	-
EcPR49	Poultry	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	ATM - FEP - CTX - ENR - CIP - STX - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR50	Poultry	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 8 / cit}	FIB	D	AMC - ATM - CAZ - FEP - CTX - NOR - STX - TET - GEN - NAL - FOX	-	-
EcPR51	Beetle	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 - FIB	D	ATM - FEP - CTX - STX - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR52	Beetle	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 - FIB	D	ATM - FEP - CTX - STX - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR53	Beetle	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2 / bla} _{TEM}	I1 - FIB	D	ATM - FEP - CTX - STX - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR54	Beetle	3	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1 / bla} _{TEM}	I1 - FIB	B1	ATM - FEP - CTX - STX - TET - GEN	-	-
EcPR55	Bedding	3	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	ATM - FEP - CTX - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR56	Poultry	1	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	ATM - FEP - CTX - ENR - NOR - CIP - TET - GEN - NAL	-	-
EcPR57	Poultry	2	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1}	-	D	ATM - CAZ - FEP - CTX - ENR - NOR - CIP - NIT - STX - FOT - TET - GEN - NAL	-	+
EcPR58**	Water	3	3°	-	-	D	ENR - STX - GEN - NAL	-	-
EcPR59**	Water	3	3°	-	-	D	ENR - STX - GEN	-	-

** *E. coli* strains isolated in MacConkey agar without supplement with cefotaxime

Table 3. Phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* strains isolated from poultry farms in Rio Grande do Sul.

Strain	Source	Farm	Period	ESBL/AmpC genes	Inc. Group.	Phylogenetic group	Antimicrobial resistance	<i>mcr-1</i> gene	<i>fosA3</i> gene
EcRS01**	Poultry	4	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	TET – GEN	-	-
EcRS02**	Poultry	4	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	D	AMC – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS03**	Poultry	5	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	AMC – TET – GEN	-	-
EcRS04**	Water	5	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>bla</i> _{TEM}	FIA - FIB – FIC	B1	-	-	-
EcRS05**	Bedding	5	1°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB - FIC	B1	TET – GEN	-	-
EcRS06**	Bedding	4	1°	-	FIB	A	AMC – CHL – TET – NAL	-	-
EcRS07**	Poultry	6	1°	<i>bla</i> _{TEM}	I1 - FIB	B1	-	-	-
EcRS08**	Poultry	6	1°	<i>bla</i> _{TEM}	I1 - FIB	D	-	-	-
EcRS09	Poultry	4	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 - FIB	D	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS10	Poultry	4	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 - FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – TET – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS11	Bedding	6	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS12	Poultry	6	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8}	I1 - FIB	B2	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS13	Poultry	6	2°	<i>bla</i> _{TEM} / <i>cit</i>	FIB	B1	AMC – ATM – CAZ – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS14	Poultry	5	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS15	Poultry	5	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 – FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – STX – TET – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS16**	Feed	6	1°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB	A	NAL	-	-
EcRS17	Bedding	6	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 – HI2 – FIB	B1	ATM – FEP – CTX – FOT – TET – GEN	-	-
EcRS18	Bedding	5	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	B1	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – CHL – TET – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS19	Poultry	4	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 1} / <i>bla</i> _{TEM} / <i>cit</i>	I1 – FIB	D	AMC – CAZ – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS20	Poultry	4	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	AMC – ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS21	Poultry	5	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS22	Poultry	5	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 – FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – TET – GEN – NAL	-	-

EcRS23	Bedding	7	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>cit</i>	HI2	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – FOT – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS24**	Water	5	2°	-	I1 – FIB – FIC	B1	-	-	-
EcRS25**	Water	6	2°	-	FIB	D	-	-	-
EcRS26**	Water	6	3°	<i>bla</i> _{TEM}	I1 – FIB – FIC	A	-	-	-
EcRS27	Bedding	5	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 – FIB	D	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS28	Bedding	6	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{TEM}	HI2 – FIB	B1	ATM – FEP – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL	-	-
EcRS30**	Feed	4	3°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB	A	TET	-	-
EcRS31**	Feed	4	3°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB	B2	TET – FOX	-	-
EcRS32**	Feed	5	3°	-	I1 – FIB	B2	-	-	-
EcRS33	Bedding	4	3°	-	FIB	D	TET	-	-
EcRS34	Bedding	4	3°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	ENR – NOR – CIP – NIT – TET – NAL	-	-
EcRS35	Bedding	5	3°	<i>bla</i> _{TEM}	FIB	D	ENR – NOR – CIP – NIT – TET – NAL	-	-
EcRS36	Bedding	8	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>cit</i>	I1 – HI2 – FIB	D	ENR – NOR – CIP – SXT – TET – NAL	-	-
EcRS37**	Poultry	7	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B1	CHL – TET – GEN	-	-
EcRS38**	Poultry	7	1°	<i>bla</i> _{TEM}	HI2 – FIB	B1	CHL – STX – TET – GEN	-	-
EcRS39**	Poultry	8	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	FIB	B1	-	-	-
EcRS40**	Poultry	8	1°	<i>bla</i> _{CTX-M 8}	I1 – FIB	B1	-	-	-
EcRS41	Bedding	7	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 – FIB	A	ATM – FEP – CTX – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS42	Bedding	7	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1	A	ATM – CTX – ENR – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS43**	Feed	8	2°	-	I1 – FIB	B1	FEP – TET	-	-
EcRS44	Poultry	7	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 – FIB	A	ATM – FEP – CTX – ENR – STX – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS45	Poultry	7	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	FIB	A	ATM – FEP – CTX – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS46	Poultry	8	2°	<i>cit</i>	FIB	B2	AMC – ATM – CAZ	-	-
EcRS47	Poultry	8	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS48	Bedding	8	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS49	Bedding	7	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	A	ATM – FEP – CTX – ENR – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS50	Feed	8	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS51	Feed	8	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS52	Bedding	7	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	D	ATM – FEP – CTX – STX – GEN – NAL	-	-

EcRS53	Bedding	8	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	I1 – FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS54	Poultry	7	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	A	ATM – CAZ – FEP – CTX – ENR – STX – GEN – NAL	-	-
EcRS55	Poultry	7	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	-	A	ATM – FEP – CTX – ENR – STX – GEN* – NAL	-	-
EcRS56	Poultry	8	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 2} / <i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>cit</i>	FIB	A	AMC – ATM – CAZ – FEP – CTX – STX – TET – GEN – FOX	-	-
EcRS57	Poultry	8	3°	<i>cit</i>	-	D	AMC – ATM – CAZ – CTX – ENR – NOR – CIP – STX – TET – GEN – NAL – FOX	-	-
EcRS58**	Bedding	6	3°	<i>bla</i> _{CTX-M 8} / <i>bla</i> _{TEM}	I1 – FIB	B1	ENR – NOR – CIP – CHL – STX – TET – NAL	-	-
EcRS59**	Water	4	2°	<i>bla</i> _{TEM}	-	A	ENR – NOR – CIP – TET – NAL	-	-
EcRS60**	Bedding	8	2°	<i>bla</i> _{CTX-M 2}	I1 – FIB	A	ATM – FEP – CTX – STX – TET – NAL	+	-

** *E. coli* strains isolated in MacConkey agar without supplement with cefotaxime

Table 4. Distribution of ESBL-producing *E. coli* strains according to combination genes and sources in PR and RS states.

	Poultry litter		Poultry		Poultry Feed		Beetle	
	PR	RS	PR	RS	PR	RS	PR	RS
CTX-M1	-	-	1	-	1	-	3	-
CTX-M1 + <i>fosA3</i>	3	-	3	-	-	-	2	-
CTX-M1 + TEM + <i>fosA3</i>	2	-	1	-	2	-	1	-
CTX-M1 + CTX-M2 + CTX-M8	1	-	0	-	-	-	-	-
CTX-M1 + TEM	1	-	2	1	-	-	2	-
CTX-M1 + CTX-M8 + TEM + <i>fosA3</i>	1	-	0	-	-	-	-	-
CTX-M1 + <i>cit</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
CTX-M1 + CTX-M8 + <i>fosA3</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
CTX-M1 + TEM + <i>cit</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
CTX-M2	5	5	6	8	-	-	2	-
CTX-M2 + TEM	2	4	-	2	-	-	2	-
CTX-M2 + <i>mcr-1</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
CTX-M8 + <i>fosA3</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
CTX-M8 + <i>cit</i>	-	-	2	-	-	-	-	-
CTX-M2 + CTX-M8	-	-	-	1	-	-	-	-
CTX-M2 + CTX-M8 + <i>cit</i>	-	2	-	1	-	-	-	-
CTX-M2 + <i>cit</i>	-	1	-	0	-	-	-	-
TEM + <i>cit</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>cit</i>	-	-	-	1	-	-	-	-

Table 5. Phylogenetic distribution of 78 ESBL producing *E. coli* strains and 39 non-ESBL-producing *E. coli* strains according to isolate source.

	ESBL producer – number of strains (%)					Non-ESBL producer – number of strains (%)				
	A	B1	B2	D	TOTAL	A	B1	B2	D	TOTAL
Poultry Litter	12 (15.4%)	9 (11.5%)	0 (0%)	8 (10.3%)	29	2 (5.1%)	2 (5.1%)	3 (7.7%)	5 (12.8%)	12
Poultry	6 (7.7%)	3 (3.8%)	1 (1.3%)	23 (29.5%)	33	1 (2.6%)	5 (12.8%)	1 (2.6%)	4 (10.3%)	11
Poultry Feed	0 (0%)	1 (1.3%)	0 (0%)	3 (3.8%)	4	4 (10.3%)	0 (0%)	2 (5.1%)	1 (2.6%)	7
Water	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0	2 (5.1%)	4 (10.3%)	0 (0%)	3 (7.7%)	9
Beetle	0 (0%)	4 (5.1%)	1 (1.3%)	7 (9%)	12	NS (0%)	NS (0%)	NS (0%)	NS (0%)	NS

NS – Not Sampling

Figure 1

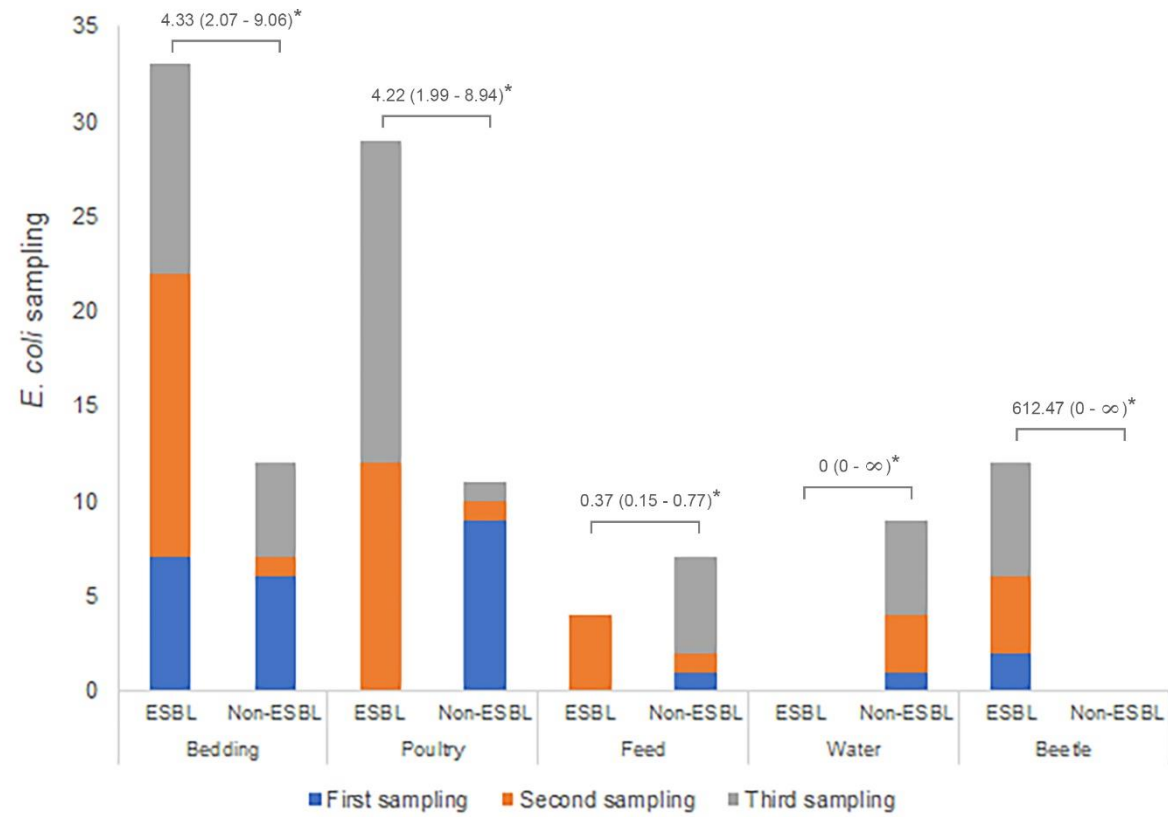
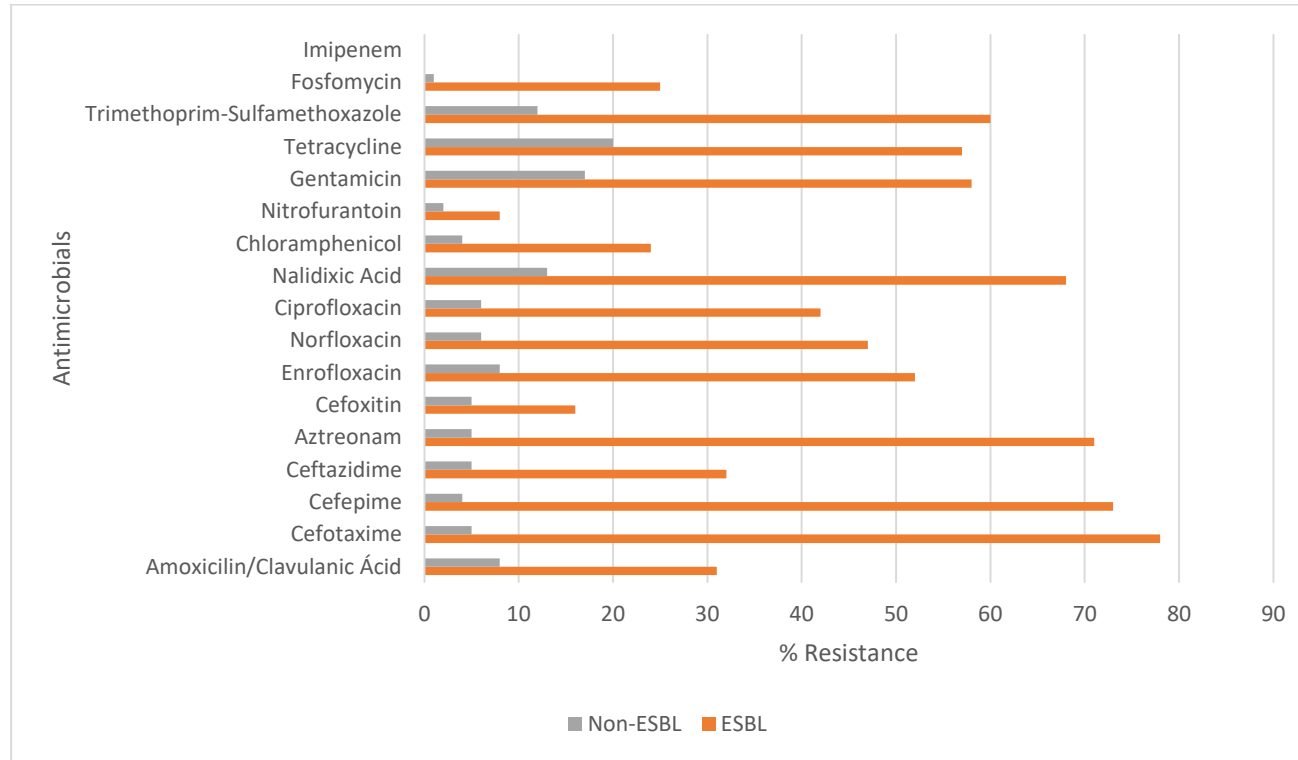


Figure 2



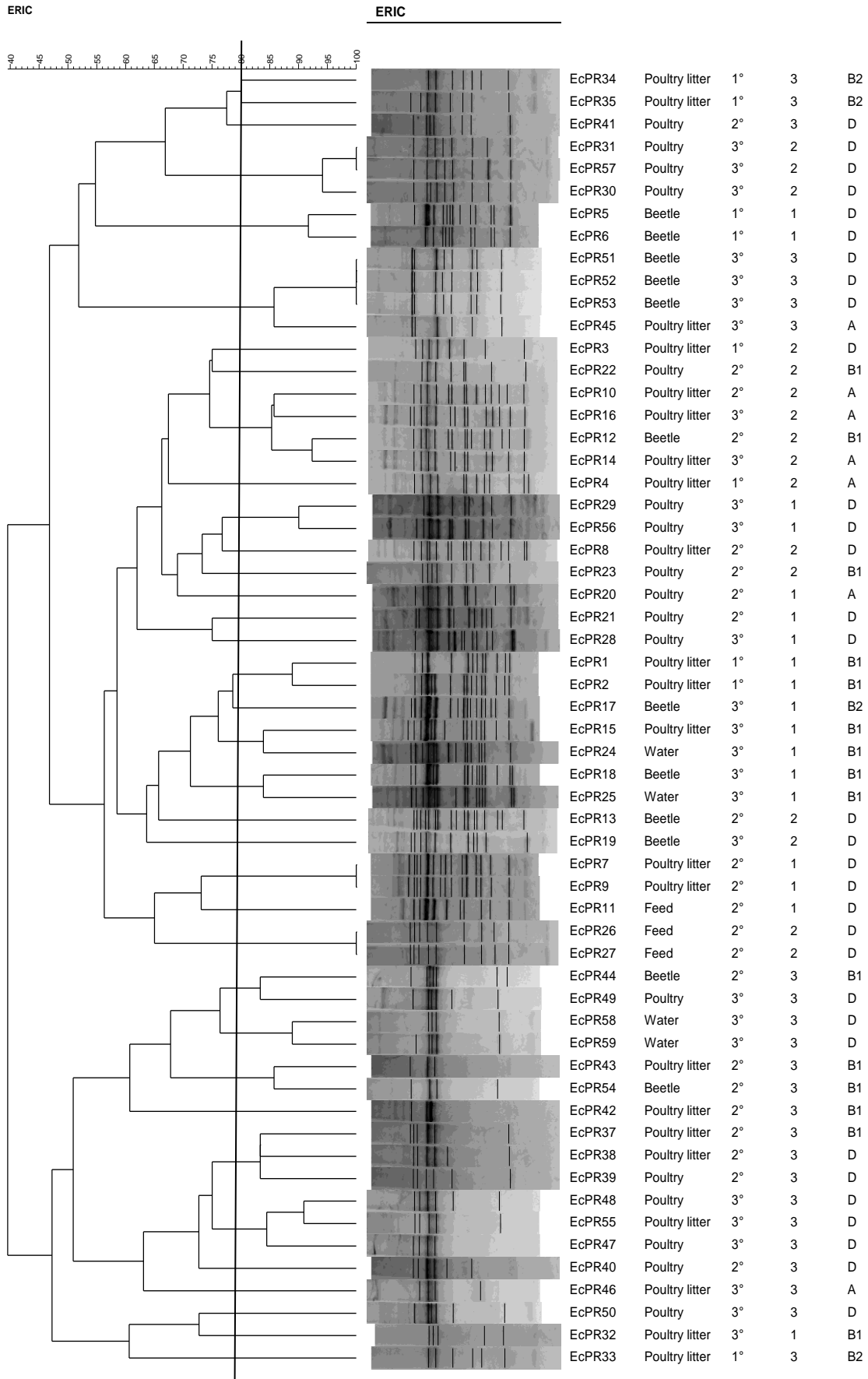


Figure 3.

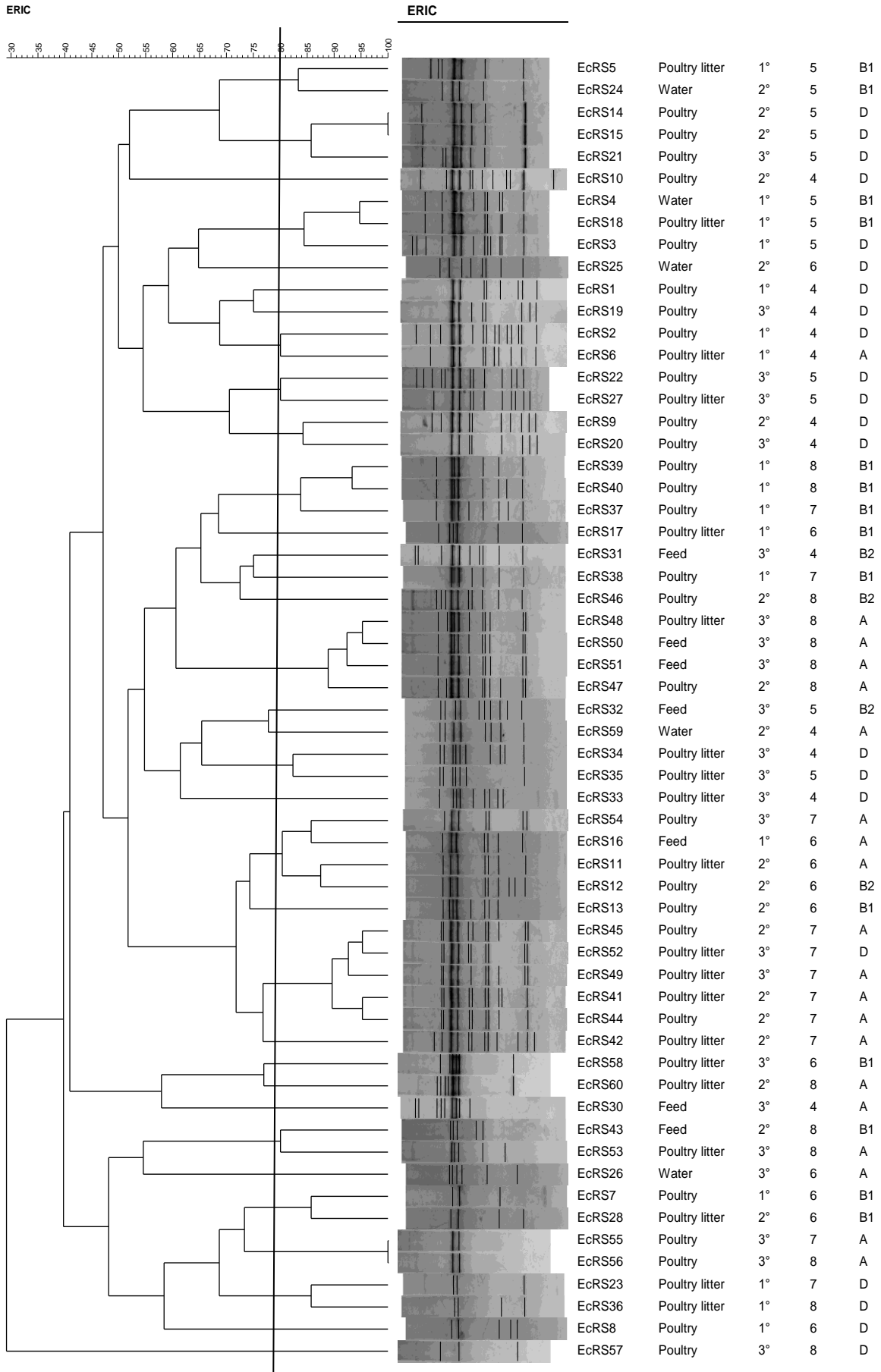


Figure 4.

6.0 CONCLUSÃO

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

- A cama de frango e os besouros (*Alphitobius* sp.) são pontos críticos na produção de frangos de corte, das granjas do sul do Brasil.
- A maioria das *E. coli* foram classificadas como multirresistentes
- O gene predominante entre *E. coli* produtora de ESBL deste estudo foi o *bla*_{CTX-M2}.
- Os plasmídeos mais frequentes entre as amostras foram Inc11 e o IncFIB.
- *E. coli* produtora de ESBL está distribuída entre os grupo A, B1 e D.
- Cepas apresentando o gene *fosA3* estão presentes nas granjas do Paraná.
- Existe uma grande diversidade de clones de *E. coli* produtora de ESBL, indicando que a disseminação da resistência pode ocorrer de forma horizontal.