



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA SIGNOLFI CYOIA

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
E VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE
ESBL ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO**

Londrina
2018

PAULA SIGNOLFI CYOIA

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
E VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE
ESBL ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO**

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

Londrina
2018

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

Cyoia, Paula Signolfi.

Caracterização dos mecanismos de resistência e virulência de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de carcaças de frango / Paula Signolfi Cyoia. - Londrina, 2018.

73 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

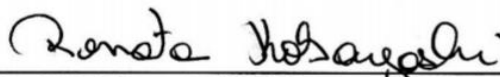
1. Bacteriologia - Tese. 2. Saúde alimentar - Tese. 3. Microbiologia aplicada - Tese. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

PAULA SIGNOLFI CYOIA

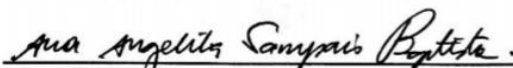
**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E
VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE ESBL
ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO**

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.

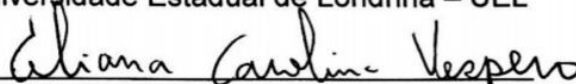
BANCA EXAMINADORA



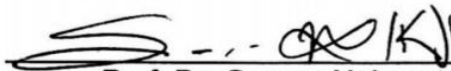
Profª Drª Renata K. Takayama Kobayashi
(orientadora)
Universidade Estadual de Londrina – UEL



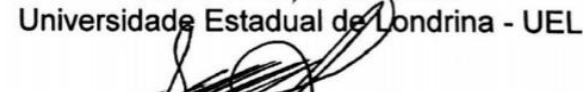
Profª Drª Ana Angelita Sampaio Baptista
Universidade Estadual de Londrina – UEL



Profª Drª Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL



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



Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de Setembro de 2018.

Dedico este trabalho a minha família e em especial ao meu marido, Willians, que de forma carinhosa e paciente me deram forças e coragem, para me apoiar nos momentos de dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que me ajudaram, ensinaram e apoiaram ao longo desses quatro anos. Foi uma verdadeira rede de solidariedade, afeto, e descoberta, de que não é pelo “*valor de p*” que descobrimos a significância das pessoas!

Primeiramente, de coração, queria agradecer a Deus. O caminho até aqui não foi curto e nem fácil, e foi Ele que me ajudou a levantar nas horas mais difíceis para que eu não desistisse jamais.

Agradeço imensamente ao meu marido, Willians L. L. Rodrigues, que esteve ao meu lado desde o início, quando ainda não sabia nem onde faria o Doutorado, no exterior ou no Brasil, mas mesmo assim me incentivou e motivou sabendo dos desafios que iríamos enfrentar. E, ao invés de me deter, me impulsionou com mais força, porque sabia que eu era capaz.

Aos meus pais, Akio Cyoia e Cleide Aparecida S. Cyoia, e minha irmã, Flávia S. Cyoia, os mais profundos agradecimentos. Pois, foram vocês que me passaram lições de paciência e esperança, e sempre me lembravam da importância dos estudos e das oportunidades. Obrigada por todo esforço ao longo não só do meu Doutorado, mas sim da minha vida toda, para minha formação pessoal e profissional.

Sou grata também ao meu sogro e sogra, Edevaldo L. Rodrigues e Ofélia L. Rodrigues, assim como todos meus cunhados e cunhadas, que também sempre estiveram presentes e cuidaram muito bem do Willians no período do meu Doutorado Sanduíche no Canadá.

À minha amiga querida de longa data, Amanda C. Canezin, por todo o amor e carinho que dedicou a mim durante esse processo. Pelos momentos de descontração para aliviar a carga de dias pesados, e a mesma alegria para os demais dias; por todas as campanhas de orações e jejum para minha capacitação e vitória. Obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi, que resumí-la como apenas “minha orientadora” é muito pouco. Também te enquadro na qualidade de mãe e amiga, que ao longo desses 10 anos de acompanhamento acadêmico, me deu muitos conselhos, me inspirou demais e me deu confiança para novos projetos. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassou a Tese, e pelo imenso

carinho nos momentos de distância, dificuldade e de dor.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, que praticamente me co-orientou nessa Tese, meu muito obrigada. Presente ao longo desses anos, sempre disposto a ensinar, um exemplo de profissional a ser seguido. Fez sempre do nosso local de trabalho um ambiente mais leve no qual era mais atrativo para se trabalhar. Agradeço pelo acolhimento em seus projetos, e pela ajuda e correção de tantos outros trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL, nosso NIP3, “o melhor laboratório do mundo”, por tudo que vivemos e convivemos nessa longa jornada. Fiquei tantos anos trabalhando nesse ambiente fraterno, que considerei sempre uma extensão da minha casa e família. Vi muitos chegarem e partirem, e agora quem vai sou eu. Levo comigo todo o aprendizado e amizade que fiz durante todo esse tempo. Obrigada amigos por todos os conselhos, apoio, risadas, festas, e trabalho também. Vocês são co-autores da minha vida acadêmica com toda certeza.

Queria agradecer ao Dr. Benito Guimarães de Brito e à Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito pela identificação e cessão das amostras provenientes do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

Aos professores, técnicos e alunos dos outros laboratórios da UEL (NIP 5, NIP 9, Laboratório de Bacteriologia, Laboratório de Virologia), que me ajudaram nos meus experimentos, mesmo que indiretamente, pelo fornecimento de materiais e aparelhos para que eu desenvolvesse minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Charles M. Dozois, por aceitar ser meu co-orientador no Doutorado Sanduíche no Canadá. Obrigada pela oportunidade, confiança e amizade.

Obrigada a todos meus amigos do Doutorado Sanduíche no Institut Armand-Frappier (IAF), Montreal, Canadá: Sébastien, Arnaldo, Katerina, Hajer, Hicham, Hossein, Privil, Rémi, que não mediram esforços para me ensinar a rotina deles, que foram pacientes ao me acompanhar nos experimentos e me ensinaram novas técnicas para somar às minhas. Além disso, me auxiliaram com a língua francesa e também com os costumes locais. Passamos por muita coisa juntos, inclusive, frio!

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UEL que dispõe

de vários profissionais capacitados que colaboraram para minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina, à Fundação Araucária, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e suporte financeiro, inclusive, para realização do Doutorado Sanduíche, e realização desta pesquisa.

Obrigada a todos que de alguma forma ajudou para que eu chegasse aqui. Palavras não são suficientes para tanta gratidão!

CYOIA, Paula Signolfi. **Caracterização dos mecanismos de resistência e virulência de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de carcaças de frango**. 2018. 70 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Os animais são os principais reservatórios de patógenos zoonóticos, muitos destes albergando não somente genes de virulência, mas também genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos como os codificadores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Tanto patógenos produtores de ESBLs como outros antimicrobianos como colistina e fosfomicina vem sendo detectados em humanos, e ultimamente, estudos relatam cada vez mais frequentes na população bacteriana circulante em animais de produção. Isso pode indicar que essas enzimas não são menos prevalentes em outros animais do que em humanos, mas que elas podem não ter sido amplamente procuradas na microbiota animal. Por isso, o objetivo deste estudo foi analisar a distribuição da resistência aos antimicrobianos (ESBL, fosfomicina e colistina), e a distribuição dos fatores de virulência (FV) em *E. coli* isoladas de 98 carcaças de frango comercializadas no sul do Brasil, e assim avaliar seu risco zoonótico. Um total de 409 amostras de *E. coli* foram isoladas e submetidas à detecção de genes que codificam FV descritos em *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado por difusão em ágar, e a caracterização genotípica pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras apresentaram resistência a múltiplas drogas (MDR), além da presença de isolados produtores de ESBL (29%), colistina (0,7%) e a fosfomicina (0,7%). As maiores prevalências de FV foram observadas nos isolados pertencentes aos grupos CTX-M quando comparadas as demais linhagens sensíveis ou mesmo nas amostras com outros tipos de resistência, sendo que 58% dos isolados produtores de ESBL possuíam três a cinco genes de virulência. Além disso, observou-se que *E. coli* produtoras de ESBL têm 2,18 vezes mais chances de apresentar três a cinco genes de virulência do que as não produtoras de ESBL. Outro dado importante encontrado neste estudo foi a conjugação bem-sucedida de *E. coli* produtora de ESBL isolada de carcaça de frango com um isolado receptor (*E. coli* J53), sugerindo que os determinantes genéticos que codificam as enzimas CTX-M podem ter se originado de isolados bacterianos animais e poderiam ser transmitidos para a microbiota humana através da cadeia alimentar. Assim, a carne de frango pode abrigar *E. coli* MDR, contendo tanto genes de resistência quanto de virulência, o que se torna um problema de saúde pública.

Palavras-chave: ESBL. Multirresistência. Grupos filogenéticos. CTX-M. Fosfomicina.

CYOIA, Paula Signolfi. **Characterization of resistance and virulence mechanisms of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses**. 2018. 70 p. Thesis (Doctorate Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Animals are the main reservoir of zoonotic pathogens, and the detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) among *Escherichia coli* isolates has increased greatly in recent years. Both ESBLs-producing and others antimicrobials such as colistin and fosfomicin have been detected in humans, and recent studies have reported them more and more frequently in the bacterial population circulating in producing animals. This may indicate that these enzymes are no less prevalent in others animals than in humans, but they may not have been widely sought. Therefore, the aim of this study was to analyze the distribution of resistant genes (ESBL-producing, fosfomicin and colistin) and virulence factors (VF), in *E. coli* isolated from 98 chicken carcasses commercialized in southern Brazil to evaluate their zoonotic risk. A total of 409 *E. coli* strains were isolated and genes encoding VF described in extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) were detected. The antimicrobial susceptibility test was also performed by diffusion in agar and molecular characterization by the polymerase chain reaction (PCR). The samples showed multidrug resistance (MDR), besides the presence of ESBL-producing isolates, resistance to colistin and fosfomicin. The highest prevalence of VF were observed in the isolates belonging to the CTX-M groups when compared to the others sensitive strains or even in the samples with other types of resistance, whereas 58% of ESBL-producing harbored three to five virulence genes. In addition, ESBL-producing *E. coli* were found to be 2.18 times more likely to present three to five virulence genes than non-ESBLs. Another important finding in this study was the successful conjugation of ESBL-producing *E. coli* isolated from chicken carcass with a receptor bacteria (*E. coli* J53), suggesting that the genetic determinants encoding the CTX-M enzymes may have originated from animal bacterial isolates and could be transmitted to humans microbiota through the food chain. Thus, chicken meat can carry MDR *E. coli*, containing both resistance and virulence genes, which becomes a public health problem.

Keywords: ESBL. Multidrug resistance. Phylogenetic groups. CTX-M. Fosfomicin.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Número estimado de mortes em 2050 decorrentes de infecção por microrganismos resistentes20
- Figura 2** – Distribuição das principais variantes de CTX-M encontradas mundialmente ao longo dos tempos.....26
- Figura 3** – Representação da classificação filogenética de *E. coli* baseada no quadruplex de CLERMONT et al., (2013) pela detecção dos genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e no fragmento TSPE4C2.....34

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Prevalência da resistência em produtos de origem animal em países dos cinco continentes	22
---	----

ARTIGO

Artigo I

Table 1 – Distribution of resistance, virulence genes, and phylogenetic groups among 119 ESBL-producing <i>E. coli</i> isolated from chicken carcasses commercialized in Brazil	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APEC	Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Patogênica para Aves_
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Microrganismos Norte Americana)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro-Coração)
CA	Canadá
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
SBL	β-lactamases de espectro estendido
EUA	Estados Unidos da América
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)
FV	Fator de Virulência
g	Grama
ITU	Infecção do Trato Urinário
Kb	Kilobase
Kg	Kilograma
MD	Maryland
MDR	<i>Multi-drug Resistance</i> (Resistência à múltiplas drogas)
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Missouri
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
ND	<i>Not Detected</i> (Não detectado)
NMEC	<i>Neonatal Meningitis Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR>1	<i>Odds Ratio</i> maior que 1
p<0,05	Probabilidade menor que 5%
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
ton	Tonelada
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UK	<i>United Kingdom</i> (Reino Unido)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
UTI	<i>Urinary Tract Infection</i> (Infecção do Trato Urinário)
VF	<i>Virulence Factor</i> (Fator de Virulência)
β	Beta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Antimicrobianos.....	17
3.2	Resistência aos Antimicrobianos	18
3.3	<i>E. coli</i> produtoras de ESBL	23
3.4	Resistência a colistina.....	27
3.5	Resistência a fosfomicina.....	28
3.6	Fatores de Virulência (FV) envolvidos na patogenicidade de <i>E. coli</i>	29
3.6.1	<u>Aquisição de Ferro</u>	30
3.6.2	<u>Protease e Toxinas</u>	31
3.6.3	<u>Resistência sérica</u>	32
3.7	Análise Filogenética	33
4.	REFERÊNCIAS	34
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	48
5.1	Artigo I.....	49
6.	CONCLUSÕES	70

1. INTRODUÇÃO

A detecção de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) tem sido cada vez mais relatada nos últimos anos em uma ampla variedade de países, representando um problema de saúde pública. Bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamase possuem mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, onde inativa os antibióticos ao hidrolisar o anel β -lactâmico. ESBL hidrolisam as penicilinas, e também cefalosporinas de primeira, terceira e quarta geração e monobactâmicos, limitando a terapia antimicrobiana para os quais o microrganismo é suscetível, permanecendo sensível aos inibidores de β -lactamase e cefamicinas.

Apesar das bactérias resistentes serem inicialmente observadas em amostras humanas, houve um aumento na detecção de *E. coli* produtoras de ESBL em animais, tais como suínos, equinos, bovinos, cães, gatos, peixes e frangos de corte, assim como em produtos alimentares em todo o mundo.

O aumento da produção avícola foi acompanhado pelo aumento de doenças microbianas, devido à elevada densidade dos aviários. Para controlar estas doenças, optou-se pelo uso de antimicrobianos, que além de destruírem os microrganismos patogênicos, também podem atuar como promotores de crescimento. Com o uso de antimicrobianos houve um aumento de linhagens resistentes, não só no Brasil, como mundialmente.

ESBL são encontradas em *E. coli* que causa infecção em humanos, mas também são encontradas em *E. coli* isoladas de alimentos, como carnes de frango comercializada. Carne de aves apresentam os maiores níveis globais de contaminação por *E. coli*, e estas podem ser mais resistentes aos antimicrobianos do que em outras fontes.

Além da resistência encontrada em amostras de *E. coli* de frangos, também podem ser detectados múltiplos fatores de virulência envolvidos na patogênese de *E. coli*. Baseado em evidências, podemos concluir que as aves são a fonte de alimento animal mais intimamente ligada *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) humana. *E. coli* de carne de frangos possuem, mais genes de virulências semelhantes aos de ExPEC humana, sugerindo um potencial risco para causar doenças.

Por esta razão, é importante a avaliação das amostras de carne de frango quanto a presença de ESBL combinada a pesquisa de fatores de virulência, pois estes genes combinados poderão contribuir para a patogenicidade bacteriana.

Esta Tese de doutorado é dividida entre revisão de literatura sobre o tema abordado e Artigo científico I, intitulado “**Distribution of virulence and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses commercialized in Southern Brazil**”.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial risco zoonótico de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de carcaças de frango comercializados na região sul do Brasil caracterizando molecular e fenotipicamente a produção de ESBL e os fatores de virulência.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar amostras de *E. coli* nas carcaças de frango.
- Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos de uso clínico humano e animal.
- Verificar a presença de *E. coli* produtoras de ESBL molecular e fenotipicamente entre os isolados.
- Determinar a presença de genes de resistência *bla*_{CTX-M}, *mcr-1*, *fosA3* em amostras de *E. coli* isoladas da carne de frango.
- Determinar a presença de genes de virulência frequentemente encontrados em *E. coli* patogênica para aves (APEC) e em ExPEC humana nas amostras de *E. coli* isoladas das carnes de frango.
- Comparar amostras de *E. coli* produtoras de ESBL e não produtoras de ESBL, quanto a presença de genes de virulência e resistência combinados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são fármacos que atuam contra um grande número de infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas. No século XX, os antimicrobianos foram considerados fármacos milagrosos, apesar da discussão sobre seu uso na medicina humana, veterinária e na agricultura (BEOVIĆ, 2006; O'NEILL, 2016). Discussão esta que aborda a utilização indiscriminada dos antimicrobianos e conseqüentemente o aumento na taxa de infecções por microrganismos multirresistentes em humanos nas Unidades de Terapia Intensiva.

Com o aumento do número de pacientes internados acometidos por infecções, há uma preocupação com o custo do tratamento, devido a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos de primeira escolha, e conseqüentemente com o risco da elevação do índice de mortalidade (BEOVIĆ, 2006; O'NEILL, 2016).

Os antimicrobianos são os principais fármacos utilizados no tratamento de infecções no ambiente hospitalar. Desde as primeiras indicações do uso dos antimicrobianos, houve relatos de resistência bacteriana sendo atualmente complexa, e ocorrendo em diversas bactérias de importância médica (GURGEL; CARVALHO, 2008; O'NEILL, 2016). Porém, a disseminação da resistência microbiana, afeta não somente a área médica (hospitalar e comunidade), como também a área agrônômica e veterinária (SFACIOTTE; VIGNOTO; WOSIACKI, 2014).

O uso de antimicrobianos na medicina veterinária foi introduzido pouco depois da comercialização para a saúde humana. Apesar de alguns antimicrobianos serem exclusivos ao uso veterinário, pertencem às classes de antimicrobianos utilizados na saúde humana e possuem a estrutura muito semelhantes (por exemplo os macrolídeos e as fluoroquinolonas) (VAN PUYVELDE; DEBORGGRAEVE; JACOBS, 2018).

O uso desses fármacos na veterinária foi designado para basicamente quatro fins diferentes: tratamento terapêutico, metafilático, profilático e como promotores de crescimento (ARIAS; MAIO, 2012). Os antimicrobianos usados como promotores de crescimento, são adicionados, em níveis sub-terapêuticos, às dietas de animais criados para a produção de carne durante muitos anos. Assim, eles ajudam a reduzir

as respostas inflamatórias, poupando o sistema imunológico, o que leva à redução da morbidade e mortalidade, bem como doenças subclínicas e clínicas (NIEWOLD, 2007). Apesar dos benefícios na produção animal, promotores de crescimento aumentam o risco de seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos, o que levou as autoridades governamentais a reverem o seu uso (BARROS et al., 2012).

Com isso, a Comissão Europeia decidiu proibir progressivamente a utilização e comercialização de alguns antibióticos como promotores de crescimento em dieta para animais a partir de janeiro de 2006 (Regulamentação Comissão Europeia No. 1831/2003). Contudo, o uso de antimicrobianos como promotor de crescimento é uma prática ainda muito comum em algumas partes do mundo (PIKKEMAAT et al., 2016). Aproximadamente 70% de todos antimicrobianos utilizados em animais de criação são usados para fins não terapêuticos (CANTAS et al., 2013).

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento não levou a efeitos adversos na produção animal, porém, resultou na resistência aos antimicrobianos em suínos e aves, principalmente (CANTAS et al., 2013). A baixa acessibilidade a cuidados veterinários qualificados, tais como vacinação e a falta de conscientização, agravam o problema de resistência em países subdesenvolvidos (VAN PUYVELDE; DEBORGGRAEVE; JACOBS, 2018).

Assim, a resistência aos antimicrobianos na área veterinária é de extrema preocupação, já que vários estudos relatam a presença de microrganismos Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR) em animais e nos produtos de origem animal.

3.2 Resistência aos Antimicrobianos

Na última década, ocorreu um aumento significativo tanto na proporção quanto no número de microrganismos potencialmente patogênicos que apresentam multirresistência aos antimicrobianos (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Diversas organizações, como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estão considerando estas infecções causadas por bactérias MDR como uma doença global emergente, ou seja, um grande problema de saúde pública (CHAUDHARY, 2016).

Acredita-se que até 50% dos antimicrobianos são utilizados de maneira inadequada, e que todos os anos, aproximadamente 2 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América (EUA) são infectadas por um patógeno resistente (O'NEILL, 2016). A situação é ainda mais complicada em países subdesenvolvidos devido a falta de sistemas de vigilância eficazes, diagnósticos laboratoriais rápidos e acesso a antimicrobianos apropriados frente as limitações financeiras (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; O'NEILL, 2016).

Os países da América Latina em geral, quando comparados aos EUA e Europa, apresentam mais casos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, principalmente por bactérias Gram-positivas, incluindo MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e por bacilos Gram-negativos não fermentadores, enterobactérias produtoras de ESBL (CHAUDHARY, 2016; ROSSI, 2011).

Estima-se ainda que em 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão em decorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, tornando-se a maior causa de mortalidade, ultrapassando, o câncer (Figura 1) (O'NEILL, 2016).

O surgimento de microrganismos resistentes pode ocorrer tanto por mutações quanto pela aquisição de elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência, podendo ocorrer independentemente da presença de agentes antibacterianos (ROCA et al., 2015). Assim, por pressão seletiva os patógenos resistentes são selecionados e se disseminam devido a exposição aos antimicrobianos.

Portanto, as taxas crescentes de resistência podem ser encontradas no abuso e uso indevido de agentes antimicrobianos, sejam usados em pacientes e animais ou liberados no meio ambiente (GURGEL; CARVALHO, 2008). Assim, a resistência antimicrobiana tornou-se uma ameaça global à saúde, exige a ação coordenada de muitas partes, e não só da área médica, para combater a resistência aos antibióticos (SFACIOTTE; VIGNOTO; WOSIACKI, 2014).

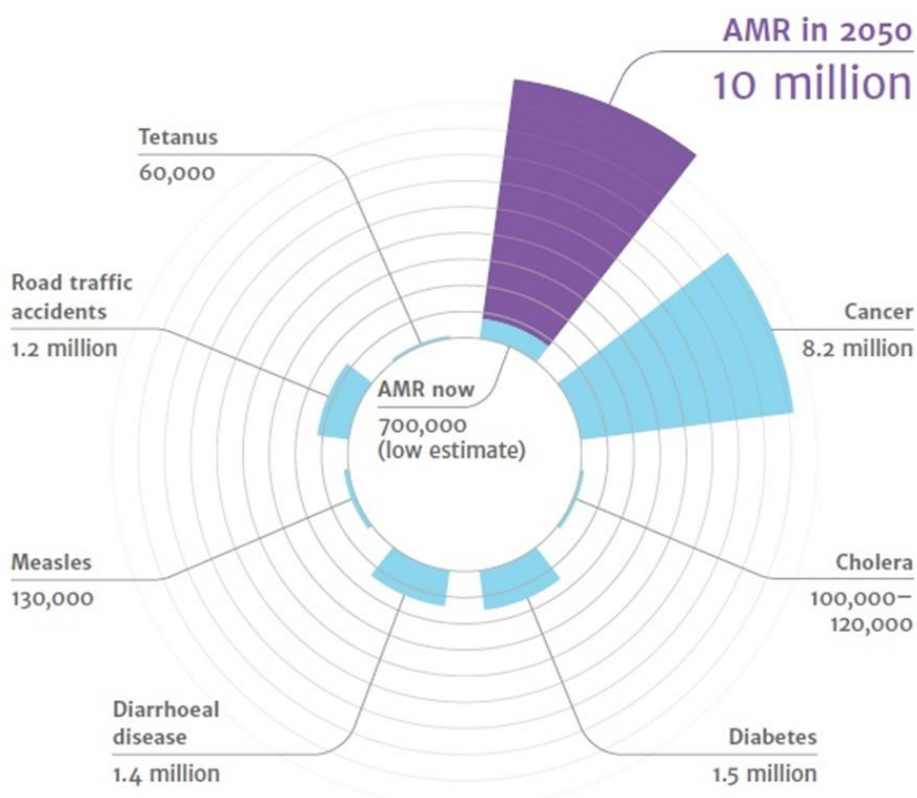


Figura 1. Número estimado de mortes em 2050 decorrentes de infecção por microrganismos resistentes (O'NEILL, 2016).

Há uma preocupação, a nível mundial, quanto ao uso em excesso de antimicrobianos na produção animal, já que foram relatados o aparecimento de bactérias resistentes nos mesmos. Há a possibilidade desses microrganismos do alimento passarem genes de resistência para bactérias da microbiota humana através do consumo da carne na dieta, reduzindo a eficiência dos antimicrobianos usados no tratamento de infecções hospitalares e comunidade (CHANTZIARAS et al., 2014; GARCIA-MIGURA et al., 2014; STANTON, 2013).

Animais de produção são considerados os principais reservatórios de *Salmonella* spp., *E. coli* e *Campylobacter* spp., que causam infecções em humanos. Esses patógenos, potencialmente zoonóticos, se espalham para os seres humanos diretamente através do contato direto ou via cadeia alimentar, muitas vezes por meio do manuseio e do cozimento inadequado dos alimentos, ou indiretamente da poluição ambiental dos efluentes agrícolas, causando na maioria dos casos uma doença diarreica autolimitada (CARATTOLI, 2008; ROCA et al., 2015).

Atualmente, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, exportando para mais de 150 países, sendo a carne de frango o sexto produto de

exportação que mais acumulou receita cambial no País em 2018 (SINDIAVIPAR, 2018). É também o segundo maior produtor de carne de frango, atrás somente dos EUA (ABPA, 2018). Apesar disso, não há relatos na literatura sobre a quantidade específica de antimicrobianos consumidos no país pela produção animal (BEZERRA et al., 2017). Os números exatos para uso mundial de antimicrobianos na produção de alimentos não estão disponíveis, apenas algumas estimativas são relatadas por alguns órgãos e estudos (OMS, 2014).

O Reino Unido relatou em 2003 que o uso de cefalosporina na medicina veterinária totalizou 3 toneladas (ton) (CARATTOLI, 2008). Alguns dados fornecidos pelo Instituto de Saúde Animal nos EUA estimam que mais de 8000 ton de antimicrobianos são usados na produção de alimentos, correspondendo a 4 a 25 g de antibióticos/ton de ração. Em 2014, a FDA (Food and Drug Administration) dos EUA publicou uma nota anunciando a retirada voluntária do mercado de 16 antimicrobianos utilizados na produção de animais para a alimentação (FDA, 2014). No ano seguinte, lançaram o Plano Nacional de combate à Bactérias Resistentes aos Antibióticos, no qual exigia receitas de médicos veterinários para antibióticos de importância para a medicina humana (WATTAGNET, 2015).

No Brasil, um estudo de 2015 mostrou que em 2007, 73,8% das amostras de *E. coli* isoladas de carcaça de frangos refrigerados comercializados, apresentaram resistência à três ou mais antimicrobianos. Quando comparado a amostras isoladas em 2013, essa resistência aumentou para 79,3% dos isolados, sendo que 65,4% das carcaças apresentaram isolados produtores de ESBL, o que não foi encontrado em 2007 (KOGA et al., 2015a).

Estima-se que em 2010, o consumo global de antibióticos na criação de animais para a alimentação humana foi de 63.151 ton. Países como China, os EUA, o Brasil, a Alemanha e a Índia foram os que mais fizeram uso de antimicrobianos na produção animal, sendo responsáveis por 50% do volume total empregado (VAN BOECKEL et al., 2015). Portanto, acredita-se que a quantidade de antimicrobianos utilizada por esses países foi cerca de 45 mg/kg para bovinos, 148 mg/kg para frangos e 172 mg/kg para suínos. Em 2030, o estimado é que seja utilizado cerca de 105.596 ton de antibióticos na produção animal, um crescimento de 67% comparado a 2010 (VAN BOECKEL et al., 2015).

Portanto, o que comprova a utilização de antimicrobianos na produção de carne tanto no Brasil como mundialmente, são os estudos realizados em cada

região, que descrevem a presença e disseminação de patógenos zoonóticos produtores de ESBL, MDR, fosfomicina e colistina resistentes (KOGA et al., 2015b; LAAREM et al., 2017; NGUYEN et al., 2016).

De acordo com a Tabela 1, o alto índice de resistência entre os microrganismos é observado frente a diferentes tipos de antimicrobianos, variando de acordo com os continentes. Dentre os tipos de resistência, os mais encontrados foram os isolados de *E. coli* produtoras de ESBL e amostras de *E. coli* e *Salmonella* spp MDR e resistente à colistina.

Tabela 1. Prevalência da resistência em produtos de origem animal em países dos cinco continentes.

País	Ano de coleta	Origem	Bactéria	Resistência	Prevalência (%)	Referências
OCEANIA						
Austrália	2013-2014	Bovinos	<i>E. coli</i>	MDR	26	Abraham et al. (2015)
		Aves	<i>E. coli</i>	MDR	33	
		Suínos	<i>E. coli</i>	MDR	79	
		Ovinos	<i>E. coli</i>	MDR	22	
EUROPA						
Alemanha	2008-2014	Bovinos, aves e suínos	<i>E. coli</i>	MDR	88,1	Michael et al. (2016)
Suíça	2015	Carne de aves	<i>E. coli</i>	ESBL	19,4	Zogg et al. (2016)
Países europeus	2004-2013	Bovinos e suínos	<i>E. coli</i>	Colistina	19,3	El Garch et al. (2017)
		Bovinos e suínos	<i>Samonella</i> spp.	Colistina	4	
Reino Unido		Carne bovina	<i>E. coli</i>	ESBL	1,9	Randall et al. (2017)
		Carne de frango	<i>E. coli</i>	ESBL	65,4	
		Carne suína	<i>E. coli</i>	ESBL	2,5	
AMÉRICA						
EUA	2012-2013	Carne bovina	<i>C. jejuni</i>	Fluoroquinolona	35,4	Tang et al. (2017)
		Carne bovina	<i>C. coli</i>	Fluoroquinolona	74,4	
Canadá	2004-2011	Carne de frango	<i>E. coli</i>	Gentamicina	58,4	Chalmers et al. (2017)
				Ceftiofur	58,5	

Brasil	2013 2004- 2011	Carne de frango Aves	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	MDR Tetraciclina Ampicilina	79,3 20,9 10	Koga et al. (2015a) Fitch et al. (2016)
ÁFRICA						
Etiópia	2015- 2016	Aves	<i>E. coli</i> O157:H7	MDR	92,3	Shecho et al. (2017)
Tanzânia	2013- 2014	Laticínio de bovinos, bovinos e suínos	<i>E. coli</i>	MDR	69,9	Kashoma et al. (2015)
		Laticínio de bovinos, bovinos e suínos	<i>C. jejuni</i>	MDR	40	
Uganda	2013	Laticíneos bovino	<i>S. aureus</i>	MRSA	56,1	Asiimwe et al. (2017)
Argélia	2012	Carne de frango	<i>E. coli</i>	MDR	96,6	Laarem et al. (2017)
ÁSIA						
Filipinas	-	Carne suína	<i>S. enterica</i>	MDR	67,8	Calayag et al. (2017)
China	2008- 2015	Suínos	<i>Samonella</i> spp.	MDR	81	Jiu et al. (2017)
		Frangos	<i>E. coli</i>	Ampicilina	97,8	
Vietnam	2013- 2014	Suínos	<i>E. coli</i>	Colistina	22,2	Nguyen et al. (2016)
				Ampicilina	94,4	
				Colistina	24,4	
Irã	2014- 2015	Leite, carne de aves, peixe, ovinos e bovinos	<i>C. coli</i>	MDR	90,2	Raeisi et al. (2017)
			<i>C. jejuni</i>	MDR	77,2	

ESBL: β -lactamases de espectro-estendido. MDR: Resistência a múltiplas drogas. MRSA: *S. aureus* resistente à meticilina.

3.3 *E. coli* produtoras de ESBL

A detecção de *E. coli* produtoras de ESBL tem sido cada vez mais relatada nos últimos anos em uma ampla variedade de países, representando um problema de saúde pública (EWERS et al., 2012). A produção de β -lactamase é o principal mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas

(OLSEN et al., 2014), pois estas enzimas inativam os antibióticos hidrolisando o anel β -lactâmico (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

A produção de ESBL pelas bactérias é caracterizada pela capacidade de hidrolisar, além das penicilinas, as cefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e monobactâmicos como o aztreonam, mas não hidrolisam cefamicinas como a cefoxitina. Também podem hidrolisar cefalosporinas de quarta geração, como cefepime, comprometendo a eficácia de todos os β -lactâmicos, com exceção das cefamicinas, inibidores de β -lactamases e carbapenêmicos, conferindo um fenótipo multirresistente limitando a terapia antimicrobiana para os quais o microrganismo é suscetível (BRITO et al., 2015; OLSEN et al., 2014; SARAVANAN, RAMACHANDRAN, BARABADI, 2018). Isolados produtores de ESBL ainda conferem igualmente co-resistência a cotrimoxazol, tetraciclinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (BRITO et al., 2015). Eles também são inativados pelos inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010).

Os genes que codificam estas enzimas estão localizados principalmente em elementos genéticos móveis (plasmídeos), que podem ser facilmente transferidos horizontalmente para outras bactérias, inclusive entre espécies diferentes (DIERIKX et al., 2013). Nestes plasmídeos estão localizadas diversas famílias de genes como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} (SCHAUFLEER et al., 2013). As três β -lactamases: TEM (nomeadas após a paciente Temoneira), SHV (sulfidril variável) e CTX-M (cefotaximase, primeiramente isolada em Munique e Argentina) são os representantes mais importantes das ESBLs em relação a *E. coli* que colonizam e infectam aves de criação (OLSEN et al., 2014).

Desde os anos 2000, a β -lactamase do grupo CTX-M representam os mais disseminados tipo de ESBL em humanos e em animais (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; LAUBE et al., 2013). O seu número aumentou drasticamente nos últimos anos, pois as CTX-M são as enzimas mais frequentemente encontradas em isolados clínicos de *E. coli* produtoras de ESBL (STEIN et al., 2013), o que é preocupante, uma vez que o tratamento com essa categoria de antibióticos é utilizado para infecções humanas graves. Baseado nas propriedades filogenéticas cerca de 172 variantes de CTX-M foram descritas até agora e agrupadas em cinco grupos principais: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, e CTX-M-25 (BONNET, 2004;

COMPAIN, DORCHÈNE, ARTHUR, 2018; STEIN et al., 2013; <https://www.lahey.org/Studies/other.asp>).

Dentro dos grupos de CTX-M, existem diferentes genótipos que estão distribuídos mundialmente com prevalências diferenciadas de acordo com cada região do mundo. De acordo com alguns estudos, a prevalência de ESBL aumentou ao longo dos anos em diversas áreas geográficas da OMS, sendo significativo na região europeia (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). Muitas vezes, a facilidade dessa disseminação dá-se pela difusão dos elementos genéticos móveis; clones; alimentos de origem animal, migração e sanitário (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; KARANIKA et al., 2016). Vários países em todo o mundo têm ilustrado uma tendência alarmante, onde *E. coli* produtoras de CTX-M quase sempre está associada a resistência a outras classes de agentes antimicrobianos, que incluem, resistência à trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, gentamicina, tobramicina e ciprofloxacina (PITOUT E LAUPLAND, 2008). De acordo com a Figura 2, que retrata um período entre 2005 e 2017, pode-se notar que a variante *bla*_{CTX-M-15} aumentou com o tempo na maioria dos países, e é dominante na maioria das regiões, com exceção da China, Sudeste Asiático, Coreia do Sul, Japão e Espanha, onde as variantes do grupo 9 (especialmente CTX-M-14) são dominantes, e na América do Sul, onde o *bla*_{CTX-M-2} é a variante mais significativa (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

Portanto, é evidente que *E. coli* produtora de ESBL, em especial CTX-M, seja protagonista no mundo da resistência antimicrobiana. Um relatório da Sociedade de Doenças Infecciosas da América listou *E. coli* produtora de ESBL como um patógeno de fundamental importância, para o qual novas terapias são urgentemente necessárias (PITOUT, 2012; TALBOT et al., 2006).

Diante dessa complexa resistência antimicrobiana, ficaram escassas as opções de tratamentos efetivos, assim, as polimixinas foram intensamente utilizadas na medicina humana e, em alguns países, na produção animal. O intenso uso da colistina também favoreceu o aparecimento de isolados resistentes, mediados por genes presentes tanto em cromossomos quanto em plasmídeos, sendo que esse último é preocupante pela disseminação a outras bactérias (CENTER FOR DISEASE DYNAMICS ECONOMICS AND POLICY, 2015; LIU et al., 2016).

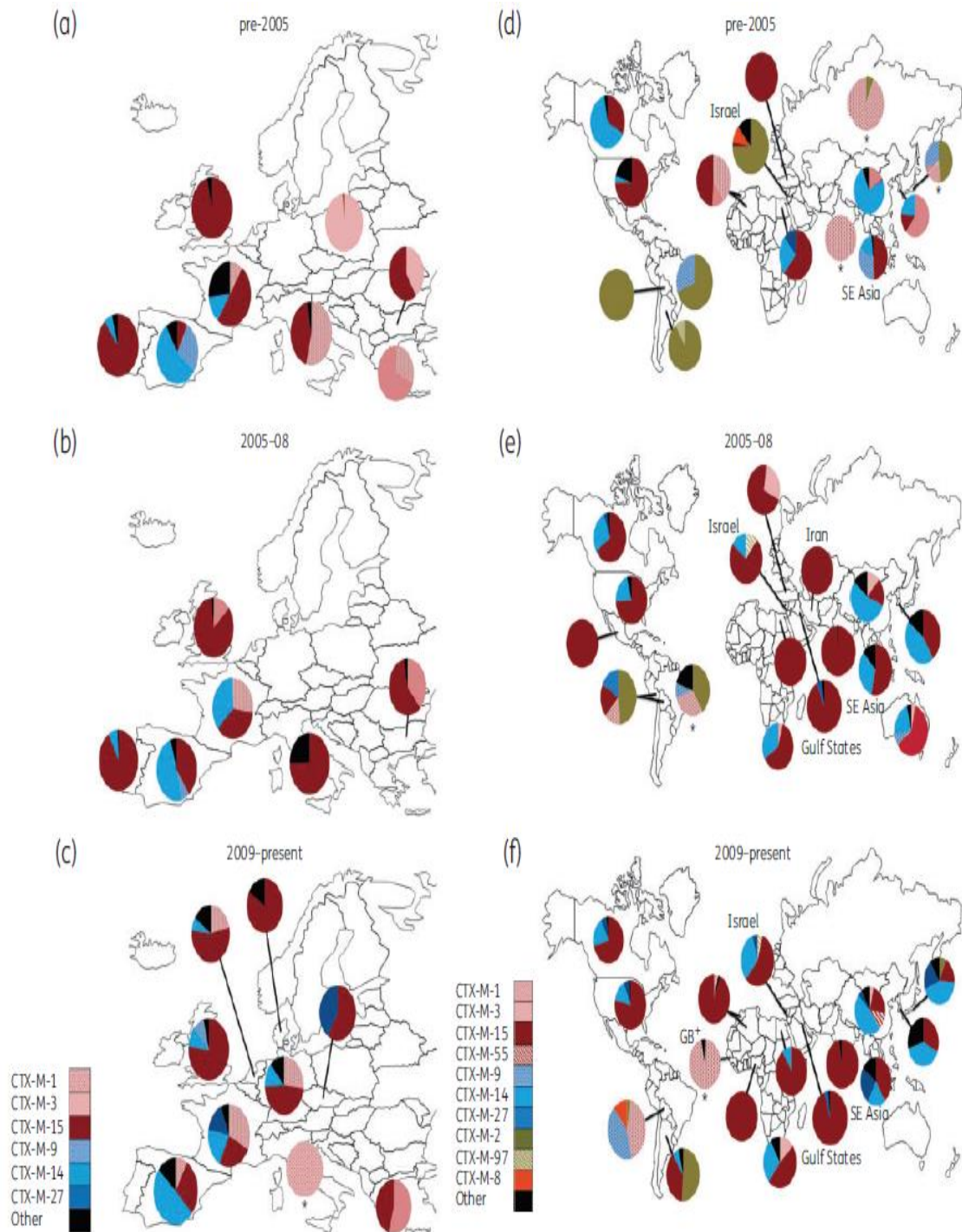


Figura 2. Distribuição das principais variantes de CTX-M encontradas mundialmente ao longo dos tempos (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

3.4 Resistência a Colistina

A colistina pertence à família das polimixinas, que são polipeptídeos catiônicos com atividade contra bactérias Gram-negativas, como a maioria das espécies da família Enterobacteriaceae, inclusive contra patógenos MDR (WANG et al., 2017). As duas polimixinas atualmente em uso clínico são polimixina B e polimixina E (colistina), que diferem apenas por um aminoácido entre si e têm atividade biológica comparável (VELKOV et al., 2013).

Descoberto em 1949, esse antimicrobiano foi muito utilizado nos anos seguintes até entrar em desuso por sua alta nefrotoxicidade e neurotoxicidade, o que resultou em mais de 20 anos sem o seu emprego na área médica (FALAGAS; KASIAKOU, 2005). Apesar disso, a colistina continuou sendo utilizada, predominantemente na criação de suínos, (KEMPF; JOUY; CHAUVIN, 2016) na medicina veterinária, por meio de práticas profiláticas ou metafiláticas, com prevalência de resistência à colistina ainda baixa (WASYL et al., 2013; QUESADA et al., 2014).

Para infecções graves causadas por Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase, as opções de tratamento são restritas e dependem de antimicrobianos como a tigeciclina e colistina - isoladamente ou em combinação com outros antibióticos (VELKOV et al., 2013). Assim, com o aumento global das Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase, houve também um aumento do uso de colistina e assim o desenvolvimento de resistência bacteriana a esse fármaco (LIU et al., 2016).

Inicialmente a resistência a colistina era conhecida em genes localizados nos cromossomos, sofrendo mutações e que dificilmente eram propagados de uma bactéria para outra (HUANG et al., 2017). No entanto, foi descrito o gene de resistência à colistina, mediado por plasmídeos, *mcr-1* (mobilized colistin resistance), que atualmente possui onze variantes e já foi identificado em várias espécies de Enterobacteriaceae de várias fontes (ambiente, alimentos, animais e humanos) (LIU et al., 2016; WANG et al., 2017). Recentemente, foram reportados quatro outros genes plasmidiais conferindo resistência a esse fármaco, o *mcr-2* (três variantes), *mcr-3* (dez variantes), *mcr-4* e *mcr-5* (ZHANG et al., 2018). Esses genes foram encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de bovinos e suínos (WANG et al., 2017; XAVIER et al., 2016).

A descrição desse gene plasmidial que codifica resistência à colistina atraiu muito interesse da comunidade científica. A disseminação rápida do gene *mcr-1* desafia a saúde pública global, isto porque pelo menos 8 tipos de plasmídeos podem transportar *mcr-1* entre Enterobacteriaceae (LIU et al., 2016; McGANN et al., 2016; WANG et al., 2017). Isolados clínicos de pacientes que nunca haviam sido expostos à colistina, foram positivas para este gene plasmidial, sugerindo a transferência da resistência de animais para humanos (VENTER; HENNINGSEN; BEGG, 2017).

3.5 Resistência a Fosfomicina

Produtos de origem avícola são a fonte de alimento animal mais intimamente ligado à bactéria ExPEC humana, como as que causam infecção do trato urinário (ITU). Como já foi dito, essa relação representa um problema de saúde pública devido a uma possível transmissão aos consumidores através da cadeia alimentar, o que leva à hipótese de que os animais podem se tornar fontes de infecção ou mesmo reservatórios à fonte persistente natural da infecção, contribuindo para a propagação destas bactérias (EWERS, 2012).

As ITU são consideradas uma das mais comuns encontradas na população em geral (LOPES e TAVARES, 2005). O agente etiológico mais comumente isolado das ITUs é a bactéria *E. coli*, responsável por aproximadamente 40% das infecções urinárias hospitalares (MASHALY, 2016) e 70-90% na comunidade. ITU é responsável por 6-8 milhões de visitas médicas anuais nos EUA e 130-175 milhões de casos diagnosticados no mundo, correspondendo ao segundo sítio mais comum de infecção na população em geral (BERGERON, 2012).

Um dos tratamentos frequentemente indicados para ITU, principalmente fora do Brasil, é a administração de um antimicrobiano antigo, a fosfomicina, devido à sua eficiência em patógenos Gram-negativos MDR e Enterobacteriaceae extremamente resistentes a outros antimicrobianos (GIANCOLA et al., 2017). A fosfomicina foi descoberta na Espanha em 1969 em culturas de *Streptomyces* (HENDLIN, 1969), sendo um antibacteriano natural com grande espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (XIE et al., 2016) que age inibindo o primeiro passo na síntese da parede celular bacteriana (BRITO et al., 2015; MASHALY, 2016).

Apesar de ser utilizado no tratamento de ITU por uropatógenos MDR, este antimicrobiano já vem sendo relatado como inadequado, desde que muitos relatos são feitos quanto a resistência bacteriana (MASHALY, 2016; XIE et al., 2016). Essa resistência pode ser tanto natural, como adquirida, principalmente pela sua extensiva administração nos tratamentos de ITU e infecções sistêmicas (PÉREZ; TAPIA; SORACI, 2014; XIE et al., 2016).

Além do uso médico da fosfomicina, esse antimicrobiano também já foi utilizado na área veterinária para tratamento de infecções de frangos e suínos na produção animal, porém não utilizado como primeira escolha (PÉREZ; TAPIA; SORACI, 2014).

Recentemente, estudos envolvendo isolados de *E. coli* de animais, mostraram presença de *fosA3*, gene que normalmente é encontrado em plasmídeos, flanqueado pelos genes IS26 transposase (HO, 2013; XIE et al., 2016), podendo assim serem transferidos de uma bactéria para outra. Essa resistência vem sendo encontrada mundialmente, principalmente em *E. coli* produtoras de CTX-M, sendo relatadas tanto em isolados clínicos como também de produtos de origem animal, por exemplo, na carne de frango (XIE et al., 2016).

3.6 Fatores de virulência (FV) envolvidos na patogenicidade de *E. coli*

Os FV incluem mecanismos que contribuem para a instalação do patógeno no tecido hospedeiro, ultrapassando as barreiras de defesa do sistema imune, podendo os genes responsáveis pela codificação destes fatores estar nos cromossomos, fagos ou plasmídios (PITOUT, 2012).

Por apresentar estas características especiais, podem colonizar diferentes sítios extraintestinais, sobreviver em ambientes com baixa concentração de ferro, escapar do sistema imune do hospedeiro, resistir às células de defesa e à atividade lítica do soro, invadir tecidos, além de produzir substâncias citotóxicas como hemolisinas e fator necrotizante citotóxico 1, e assim causar uma infecção (JOHNSON; RUSSO, 2002; RUSSO; JOHNSON, 2003).

Vários genes de virulência tem sido identificados em isolados de carnes de frango. Com base em evidências existentes, as aves são a fonte de alimento animal mais intimamente ligada a ExPEC humana. *E. coli* isolada de carne de frangos possuem, muitas vezes, genes de virulência muito semelhantes aos de ExPEC

humana, o que sugere um potencial risco para o aumento da patogenicidade bacteriana e assim causar doenças (MANGES; JOHNSON, 2012; STROMBERG et al., 2017).

Alguns FV que são comumente relacionados com *E. coli* isolada de frangos e ExPEC são: *iroN* (relacionado à síntese de receptores de sideróforo salmoquelina), *iutA* (relacionado à síntese de receptores de sideróforo aerobactina), *ompT* (codifica a produção de proteína de membrana externa), *hlyF* (responsáveis pela produção de hemolisina) e *iss* (confere resistência sérica à bactéria) (JOHNSON et al., 2008a). Estes FV não são comumente encontrados em isolados de amostras comensais, por essa razão, conseguem colonizar os animais sem causar danos a sua saúde (SABATÉ et al., 2006).

3.6.1 Aquisição de ferro

O ferro é elemento essencial para a multiplicação bacteriana e sua concentração é limitada em locais de infecção, em grande parte devido a fatores do hospedeiro que reduzem a sua disponibilidade. No entanto, a disponibilidade desse íon é encontrado intracelularmente nas proteínas heme e em pequena quantidade no meio extracelular (ANDREWS et al., 2003; RUSSO et al., 2002). Conseqüentemente como resultado, a aquisição de ferro é uma necessidade crítica de patógenos que se multiplicam dentro de um hospedeiro (RUSSO et al., 2002).

As bactérias patogênicas desenvolvem diversos mecanismos envolvidos na aquisição de ferro para superar seu déficit, como a síntese de sideróforos, que são quelantes de ferro e sistemas de captação de ferro de moléculas como heme, transferrina e lactoferrina (CROSA; MEY; PAYNE., 2004; ANDREWS et al., 2003). A perda desses sistemas em bactérias patogênicas diminui acentuadamente sua virulência demonstrando a correlação entre aquisição de ferro e doenças infecciosas bacterianas. Fatores que envolvem a aquisição de ferro possuem uma alta prevalência em isolados de carne de frango.

A salmoquelina e a aerobactina são sideróforos produzidos em condições de baixa disponibilidade de ferro nos fluidos corpóreos e nos tecidos de vertebrados e tem como função capturar ferro da transferrina (CAZA et al., 2011; TORRES et al., 2001). Além desses dois FV, também pode ser encontrado a yersiniabactina,

originalmente encontrado em *Yersinia* spp., que também está relacionada com a captação de ferro (JOHNSON; RUSSO, 2005).

O gene *iro*, que codifica a salmoquelina, um dos fatores de aquisição de ferro, está localizado no plasmídeo ColV e é codificado pelos genes *iroBCDEN*. Foi demonstrado que a expressão gênica de *iroN* é regulada de acordo com a concentração de ferro presente no meio (SORSA et al., 2003).

Os genes que codificam a aerobactina podem estar localizados tanto em plasmídios como no cromossomo bacteriano. Este operon é composto por cinco genes *iucABCD* e *iutA*, dos quais quatro (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e o *iutA*, receptor de aerobactina. Este sideróforo é encontrado em *E. coli* de aves com colibacilose (APEC), como descrito por Stromberg e colaboradores (2017) em 50% ou mais, das amostras analisadas; em humanos com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%) e, também podem ser encontradas, em pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou em amostras fecais (41%), denotando a maior participação deste fator de virulência nas infecções extraintestinais (GARCIA; LE BOUGUENEC, 1996); e também em carne de frango comercializada (KOGA et al., 2015b).

3.6.2 Protease e Toxinas

Entre as proteínas identificadas em *E. coli* estão a endoprotease OmpT, hemaglutinina Tsh e a alfa-hemolisina. A proteína ompT está localizada na membrana externa que originalmente foi classificada como uma protease serina, e atualmente como uma protease aspartil (família A26) (JAROCKI, TACCHI, DJORDJEVIC, 2015).

O gene *ompT*, codifica proteínas localizadas na membrana externa e tem sido caracterizado como um ativador do plasminogênio, com a capacidade de hidrolisar a protamina e bloquear a sua entrada. As proteínas por ele produzidas ajudam na permanência da *E. coli* no hospedeiro, prolongando a infecção (VANDEPUTTE-RUTTEN et al., 2001).

As linhagens hemolíticas predominam em infecções extraintestinais humanas, tais como ITU, peritonite, apendicite, sepsis e meningite neonatal, mas também podem estar presentes em amostras isoladas de APEC e carcaças de frangos (CYOIA et al., 2015; KOGA et al., 2015b; STROMBERG et al., 2017).

A hemolisina, conhecida também como proteína formadora de poros na membrana de células, possui capacidade de lisar eritrócitos, leucócitos, granulócitos, fibroblastos e células uroepiteliais. A lise de eritrócitos aumenta a disponibilidade do íon ferro para o microrganismo, e ocorre frente a altas concentrações da alfa hemolisina. Esta proteína, em baixas concentrações, é lítica para leucócitos, monócitos e linfócitos T periféricos. A síntese, a maturação e a secreção da alfa hemolisina são determinadas pelo operon *hlyCABD*, que codifica as proteínas HlyA, HlyB, HlyC e HlyD, as quais estão envolvidas na lise das células (ISLAND et al., 1998).

O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em amostras de APEC por ser uma hemolisina aviária, e também já foi encontrada em amostra *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) (PEIGNE et al., 2009), assim como em amostras isoladas de carcaça de frangos (KOGA et al. 2015b).

3.6.3 Resistência sérica

Mecanismo de resistência ao soro é compreendido como a capacidade que determinado microrganismo apresenta em evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro. Essa capacidade é devida a alguns fatores como à presença de antígenos capsulares, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa denominadas Iss, codificada pelo gene *iss*.

O gene *iss* foi descrito pela primeira vez em *E. coli* humana associado com o plasmídio ColV pela sua capacidade de conferir resistência sérica. Este gene é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções, pois é capaz de promover a opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982). Essa característica é importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a persistir nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003).

O gene *iss* está localizado em um plasmídio conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kb, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Este plasmídio pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias não virulentas, inclusive outras *E. coli*. Deste modo, vemos a presença

desse FV em isolados de carne de frango, APEC e também em infecções extraintestinais humanas (CYOIA et al., 2015; KOGA et al., 2015b; STROMBERG et al., 2017) Quando isto ocorre, a bactéria que o recebeu adquire a capacidade de produzir aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento (JOHNSON; SKYBERG; NOLAN, 2004; JOHNSON et al., 2002).

3.7 Análise Filogenética

E. coli pode ser ainda classificada filogeneticamente pesquisando-se os genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) TSPE4.C2 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013; KOTLOWSKI et al., 2007). De acordo com a presença ou ausência destes genes, classifica-se *E. coli* como pertencentes do grupo B2, grupo D, grupo B1, grupo A, grupo C, grupo E, grupo F, clados I e II (Figura 3). O grupo C, classificado erroneamente como do grupo A pelo triplex de Clermont (2000), está mais correlacionado com o grupo B1 (CLERMONT et al., 2013; LEMAÎTRE et al., 2013). As amostras comensais pertencem principalmente ao grupo filogenético A e B1 (MORENO et al., 2005; TENAILLON et al., 2010); enquanto as patogênicas intestinais distribuem-se pelos grupos B1, D e em menor frequência pelo grupo A (SANTOS et al., 2009); e as ExPEC, são representantes do grupo B2 e também, em menor frequência, do grupo D (TENAILLON et al., 2010).

ExPEC difere de amostras de *E. coli* comensais e patogênicas intestinais não só devido a presença de diversos FV como adesinas, invasinas, toxinas, sistemas captadores de ferro; mas também por pertencerem, em sua maioria, ao grupo filogenético B2 (JOHNSON et al., 2008b). As amostras de ExPEC animal e humana que pertencem aos grupos A e B1 geralmente possuem poucos fatores de virulência apresentando portanto, baixa virulência quando comparadas as amostras de ExPEC pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D (KOGA et al., 2015b; LEMAÎTRE et al., 2013; MÜLLER; STEPHAN; NÜESCH-INDERBINEN, 2016; PAVLICKOVA et al., 2017).

Quadruplex genotype				Phylo-group	Next step
<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Could be confirmed by testing <i>ibeA</i> gene ^a
+	-	+	-	A or C	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	-	-	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	-	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	-	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	+	-	Clade I or II	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	(476) ^c	-	-	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	-	+	Unknown	Perform MLST
-	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
-	-	-	-	Unknown	Confirm <i>Escherichia</i> identification using <i>uidA</i> or <i>gadA/B</i> ^d , if positive screen using cryptic clade primers ^b and/or perform MLST

a. Gordon and colleagues (2008).

b. Clermont and colleagues (2011b).

c. The quadruplex PCR reaction will result in strains belonging to cryptic clade III, IV or V yielding a 476 bp PCR product. If this outcome eventuates then such strains should be screened using the cryptic clade detection primers (Clermont *et al.*, 2011b).

d. McDaniels and colleagues (1996).

Figura 3. Representação da classificação filogenética de *E. coli* baseada no quadruplex de CLERMONT *et al.*, (2013) pela detecção dos genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e no fragmento TSPE4C2.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da proibição do uso de antimicrobianos de maneira não terapêutica, ainda há falhas quanto a essa utilização na produção animal. Assim, a presença de genes de virulência e resistência combinados, encontrados nos produtos de origem animal, pode ser considerada um risco zoonótico, visto que nestes produtos podem ser abrigados plasmídeos que possivelmente são disseminados via cadeia alimentar, o que se torna um risco para a saúde pública.

4. 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 07 Ago. 2018.

ABRAHAM, S. et al. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 273–277, 2015.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 215-37, 2003.

ARIAS, M. V. B.; MAIO, C. M. D. DE. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, p. 775–790, 2012.

ASIIMWE, B. B. et al. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 422, 2017.

BARROS, R. DE et al. Reassessing flavophospholipol effects on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2458–2462, 2012.

BATCHELOR, M.; THRELFALL, E.J.; LIEBANA, E. Cephalosporin resistance among animal-associated Enterobacteria: a current perspective. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 3, p. 403–417, 2005.

BEOVIĆ, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 280–287, 2006.

BERGERON, C. R. et al. Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 415-421, 2012.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. 2145–2155, 2017.

BEZERRA, W. G. A. et al. Archivos de Zootecnia Antibióticos no setor avícola : uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, 2017.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, p. 654-659, 1982.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1-14, 2004.

BRITO, T. et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Susceptibility to Fosfomycin. **Medicina Interna**, v. 22, p. 131-135, 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

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

CALAYAG, A. M. B. et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* from swine slaughtered in two different types of Philippine abattoir. **Food Microbiology**, v. 65, p. 51–56, 2017.

CANTAS, L. et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–14, 2013.

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

CAZA, M.; LÉPINE, F.; DOZOIS, C. M. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 80, p. 266-282, 2011.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS ECONOMICS & POLICY. The State of the World's Antibiotics. **Center for Disease Dynamics, Economics and Policy**, v. 8, p. 30–34, 2015.

CHALMERS, G. et al. Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 149-157, 2017.

CHANTZIARAS, I. et al. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 827–834, 2014.

CHAUDHARY, A. S. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, p. 552–556, 2016.

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.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 58-65, 2013.

COMPAIN, F.; DORCHÈNE, D.; ARTHUR, M. Combination of amino acid substitutions leading to CTX-M-15-mediated resistance to the ceftazidime-avibactam combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, AAC.00357–18, 2018.

CROSA, J. H.; MEY, A. R.; PAYNE, S. M. Iron transport in bacteria. **American Society for Microbiology**, 2004.

CYOIA, P.S. et al. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, p. 1068-1075, 2015.

DIERIKX, C.M. et al. Extended-spectrum- β -lactamase and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 60–67, 2013.

EL GARCH, F. et al. *mcr-1* is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 51.e1-51.e4, 2017.

EWERS, C. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 646-655, 2012.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1333–1341, 2005.

FDA. **FDA Announces Voluntary Withdrawal of 16 Antimicrobials for Use in Food-Producing Animals**. 2014. Disponível em: < <https://www.fda.gov/> > Acesso em: 20 ago. 2018.

FITCH, F. M. et al. β -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of bla CTX-M-1 and bla CTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil—Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, p. 164–171, 2016.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 369–378, 2017.

GARCIA, M. I.; LE BOUGUENEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrheogenic *Escherichia coli*. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 4, p. 201-236, 1996.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 1–9, 2014.

GIANCOLA, S.E., et al. Assessment of Fosfomycin for complicated or multidrug-resistant urinary tract infection: patient characteristics and outcomes. **Chemotherapy**, v. 62, p. 100-104, 2017.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 118–123, 2008.

HENDLIN, D. et al. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. **Science**, v. 166, p. 122–123, 1969.

HO, P. L. et al. Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance *fosA3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 695-702, 2013.

HUANG, X., et al. High Prevalence of Colistin Resistance and *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 562, 2017.

ISLAND, M. D. et al. Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3384-3389, 1998.

JAROCKI, V. M.; TACCHI, J. L.; DJORDJEVIC, S. P. Non-proteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity. **Proteomics**, v. 15, p. 1075–1088, 2015.

JIU, Y. et al. Phenotypic and Genotypic Resistance of Salmonella Isolates from Healthy and Diseased Pigs in China During 2008–2015. **Microbial Drug Resistance**, 2016.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, p. 155-162, 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, T. J. et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v. 46, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T. J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L. K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 48, p. 351-360, 2004.

JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3987-3996, 2008a.

JOHNSON, T. J. et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7043-7050, 2008b.

KARANIKA, S. et al. Fecal colonization with extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk factors among healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 310-318, 2016.

KEMPF, I.; JOUY, E.; CHAUVIN, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 598-606, 2016.

KOGA, V. L. et al. 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**, v. 12, p. 479–485, 2015a.

KOGA, V. L. et al. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2015b.

KASHOMA, I. P. et al. Antimicrobial resistance and genotypic diversity of *Campylobacter* isolated from pigs, dairy, and beef cattle in Tanzania. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2015.

KOTLOWSKI, R. et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, p. 669-675, 2007.

LAAREM, M. et al. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, p. 143-151, 2017.

LAUBE, H. et al. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 4815-4820, 2013.

LE BOUGUENEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 471-478, 2005.

LEMAÎTRE, C. et al. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLoS One**, v. 8, p. e74423, 2013.

LIU, Y.Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 161–168, 2016.

LOPES, H. V. et al. Diagnosis of urinary tract infections. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, p. 306-308, 2005.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MCGANN, P. et al. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 4420-4421, 2016.

MASHALY, G. Activity of Fosfomycin in Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Acquired Urinary Tract Infections. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 6, p. 104-111, 2016.

MELLATA, M. et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 536-540, 2003.

MORENO, E. et al. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p. 93-99, 2005.

MÜLLER, A.; STEPHAN, R.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 667–672, 2016.

NGUYEN, N. T. et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 3727-3735, 2016.

NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, p. 605-609, 2007.

OLSEN, R. H. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **Avian Pathology**, v. 43, p. 199–208, 2014.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1–80, 2016.

PAVLICKOVA, S. et al. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 52, p. 570–576, 2017.

PEIGNE, C. et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 2272-2284, 2009.

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.

PIKKEMAAT, M. G. et al. Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. **RIKILT report 2016.009**, p. 32, 2016.

PITOUT, J. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**. v. 3, p. 9, 2012.

PITOUT, J.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 159–166, 2008.

QUESADA, A. et al. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 71–74, 2014.

RAEISI, M. et al. Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Genes of *Campylobacter* spp. Isolated from Raw Milk, Fish, Poultry, and Red Meat. **Microbial Drug Resistance**, 2017.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, p. 1138–1143, 2011.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22–29, 2015.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 449-456, 2003.

RUSSO, T. A. et al. *iroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 7156-7160, 2002.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 880-886, 2006.

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.

SARAVANAN, M.; RAMACHANDRAN, B.; BARABADI, H. The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing Enterobacteriaceae in Africa. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 180–192, 2018.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, p. 29–38, 2014.

SHARLAND, M.; SAROEY, P.; BEREZIN, E. N. The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. **Jornal de Pediatria (Versão Em Português)**, v. 91, p. 410–412, 2015.

SCHAUFLER, K. et al. ESBL-plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be "cured" of wild-type *Escherichia coli* using a heat technique. **Gut Pathogens**, v. 5, p. 34, 2013.

SHECHO, M. et al. Cloacal Carriage and Multidrug Resistance *Escherichia coli* O157:H7 from Poultry Farms, Eastern Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SINDIAVIPAR. Disponível em: www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/carne-de-frango-retoma-posicoes-na-pauta-cambial-176670. Acesso em: 03 Out. 2018.

SORSA, L. J. et al. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3285-3293, 2003.

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

STEIN, C. et al. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBL). **PLoS One**, v. 8, p. e80079, 2013.

STROMBERG, Z.R. et al. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLoS ONE**, v. 12, p. e0180599, 2017.

TALBOT, G. H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 657–668, 2006.

TANG, Y. et al. Rising fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* isolated from feedlot cattle in the United States. **Scientific Reports**, v. 7, p. 494, 2017.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 207-217, 2010.

TORRES, A. G. et al. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6179-6185, 2001.

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

VANDEPUTTE-RUTTEN, L. et al. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 5033-5039, 2001.

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.

VELKOV, T. et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, p. 711–724, 2013.

VENTER, H.; HENNINGSEN, M. L.; BEGG, S. L. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. **Essays in Biochemistry**, v. 61, , p. 1–10, 2017.

WANG, Y. et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 16260, 2017.

WASYL, D. et al. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 221, 2013.

WATTAGNET. **Obama aims to end growth-promoting animal antibiotic use.** 2015. Disponível em: <<http://www.wattagnet.com/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

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

XIE, M. et al. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Retail Meat That Harbor blaCTX-M and *fosA3* Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 2450-2455, 2016.

ZHANG, J. et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-9, 2018.

ZOGG, A. L. et al. Characteristics of ESBL-producing Enterobacteriaceae and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Swiss and imported raw poultry meat collected at retail level. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 158, p. 451–456, 2016.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados e discussões foram apresentados na forma de artigo. O artigo I foi submetido e segue as normas da revista “Frontiers in Microbiology, section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy”, e tem como título: **Distribution of virulence and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses commercialized in Southern Brazil.**

5.1 Artigo I

**Distribution of virulence and resistance genes in
Escherichia coli isolated from chicken carcasses
commercialized in Southern Brazil**

ABSTRACT

Pathogenic *Escherichia coli* found in humans and poultry carcass have similar virulence and resistance genes. The aim of this study was to analyze the distribution of virulence factors (VF), *bla*_{CTX-M} groups, *fosA3* and *mcr-1* genes in *E. coli* isolated from chicken carcasses commercialized in southern Brazil to evaluate their pathogenic risk. A total of 409 *E. coli* strains were isolated and characterized for genes encoding VF described in extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Antimicrobial susceptibility testing was performed and strains were confirmed as multidrug resistant including strains as extended spectrum of β -lactamases- (ESBLs-) producing *E. coli*, fosfomicin and colistin resistant. The highest prevalence of VF were observed in isolates which belong to CTX-M groups than the other strains that were sensible or even the strains that had other types of resistances. Also, it was noticed that ESBL strains have 2.18 times more likely to present three to five virulence genes than non-ESBL strains. An important data in this study is the successful conjugation between ESBL-producing *E. coli* isolated from chicken carcass to *E. coli* recipient strain J53 which suggested that genetic determinants encoding CTX-M enzymes may have originated from animals and could be transmitted to humans via food chain. In summary, chicken meat may be a reservoir of MDR *E. coli* harboring resistance and virulence genes, which is a public health concern.

Keywords: ESBL; multidrug resistance; phylogenetic groups; CTX-M; fosfomicin.

INTRODUCTION

Humans and others warm-blooded animals naturally have inhabitant of their intestines, as *Escherichia coli* usually a non-pathogenic commensal. Despite of this, *E. coli* could cause some extraintestinal diseases as urinary tract infection, septicemia and meningitis in human or even colibacillosis in poultry by virtue of their acquisition of virulence factors (VF) (Müller, Stephan, and Nüesch-Inderbinen, 2016).

Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains are characterized by several VF, including adhesins, invasins, protectins and toxins, as well as several uptake systems for essential nutrients such as iron (iron-uptake systems) (Johnson et al., 2008). Commensal and pathogenic *E. coli* can be classified in different phylogenetic groups, since the VF found in each of the varieties are distributed differently (Clermont, Bonacorsi, and Bingen, 2000). Therefore, most commensal strains belong to phylogenetic group A or B1, and ExPEC strains, which possess more VF than commensal strains, are assigned to phylogenetic group B2 or D (Tenailon et al., 2010).

Besides VF, it is known that the spread of resistance elements among human pathogens may be related to Enterobacteriaceae family, between them *E. coli*. Among Gram-negative bacteria resistant to antibiotics, organisms that produce ESBLs CTX-M-type are a serious public health problem worldwide (Xie et al., 2016), in which the most common detected CTX-M groups are CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 and CTXM-25 (D'Andrea et al., 2013).

Another concern is the detection of plasmidial genes mainly related to antimicrobial resistance to fosfomycin and colistin (Sato et al., 2013; McGann et al., 2016). Fosfomycin is used, especially in North America to treat urinary tract infections (UTI) mostly related to Gram-negative and Gram-positive bacteria (Giancola et al., 2017) and recently caught the attention because of the rapid spread of multidrug resistance. This resistance is related to a newly gene, *fosA3*, reported in *E. coli* and *Klebsiella pneumonia* which often is detected in *bla*_{CTX-M}-producing and multidrug-resistant *E. coli* both in animals and in clinical isolates (Ho et al., 2013). Colistin is also prescribed to treatment UTI and have many cases of resistance worldwide and renewed attention has been paid to *mcr-1* gene because it has been found not only in clinic isolates but also in animal, food, and environmental samples (Fernandes et

al., 2016; McGann et al., 2016; Rapoport, et al., 2016; Zeng et al., 2016; Skov, and Monnet, 2016).

It has been reported that pathogenic *E. coli* found in humans and poultry carcass have similar virulence and resistance genes that could be found in plasmids. These findings raise the possibility that the *E. coli* in the intestinal tract of healthy individuals could acquire those genes from chicken meat's *E. coli*, which play a role as a reservoir. Therefore, the aim of this study was to analyze the distribution of VF, *bla*_{CTX-M} groups, and the *fosA3* and *mcr-1* genes in *E. coli* isolated from chicken carcasses commercialized in southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates

E. coli strains were isolated from commercial refrigerated chicken carcass, sold in southern Brazil in 2013. Each chicken carcass was placed into the sterile packaging with 100 mL of Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). After homogenization, 0.1mL was smeared onto MacConkey agar (Neogen Corporation Lansing, Michigan) and crystal violet red neutron bile agar (Neogen Corporation Lansing, Michigan) by pour plate. Colonies suspected to be *E. coli* were confirmed by biochemical tests such as EPM-MILi and Simmons citrate agar (PROBAC, Brazil). After biochemical confirmation, one to five strains were collected from each chicken carcass and then analyzed to genotypic characteristics of virulence factors and phenotypic resistance. Only strains that showed difference in those characteristics were selected to the study.

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility was performed using the standard disk diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Antimicrobials used included 5 μ g of ciprofloxacin, 10 μ g of each of ampicillin, gentamicin, norfloxacin, and enrofloxacin, 30 μ g of each of cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, nalidixic acid, and chloramphenicol, 300 μ g of nitrofurantoin, 1.25/23.75 μ g of trimethoprim-sulfamethoxazole, 200 μ g of fosfomicin, and 20/10 μ g of amoxicillin-clavulanic acid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK). Strains resistant to third-generation cephalosporins were confirmed for ESBL

production by double-disk diffusion testing between amoxicillin/clavulanate and cefotaxime or ceftazidime (Jacoby, and Han, 1996), or by using a combination disc test including cefotaxime, cefotaxime + clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD), ceftazidime, and ceftazidime + clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD), according to the CLSI recommendations. The positive strains in the phenotypic tests to ESBL production were screened to ESBL genes and the strains resistant to fosfomycin were screened to *fosA3* gene. The *E. coli* isolate ATCC 25922 was used as a quality control to antimicrobial susceptibility testing, and the results were interpreted as CLSI criteria.

Detection of antimicrobial resistance genes

ESBL-producing *E. coli* was characterized for ESBL genes encoding CTX-M (1, 2, 8, 9, and 25 groups), TEM, and SHV type by Polymerase Chain Reaction PCR (Arlet, and Philippon, 1991; Bedeni'c et al., 2001; Woodford, Fagan, and Ellington, 2006). The presence of acquired fosfomycin resistance genes such as *fosA3* was determined by PCR using specific primer sets (Sato et al., 2013). The strains were also tested for the presence of colistin resistance gene *mcr-1* by PCR (Liu et al., 2016). PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using Image Capture Systems (LPixImageHE).

Conjugation experiments

The horizontal-transfer efficiencies of the *bla*_{CTX-M} genes were assessed by performing conjugation in agar. Transconjugants were selected on MacConkey agar containing cefotaxime 2 μ g/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and sodium azide 100 μ g/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and tested for phylogenetic group and the presence of *bla*_{CTX-M} genes (Xie et al., 2016).

Phylogenetic Classification

E. coli strains were assigned to phylogenetic groups (A, B1, B2, or D) by PCR (Clermont, Bonacorsi, and Bingen, 2000). This PCR reaction contained 1.25U Taq DNA polymerase (Life technologies, Rockville, MD) in 1x PCR buffer (Life

technologies, Rockville, MD), 0.2mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂, and 1μM of each primer. PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using Image Capture Systems (LPixImageHE).

Virulence Genes

We surveyed five VF normally studied in ExPEC strains. The selected genes were: *iutA* (aerobactin siderophore receptor gene), *hlyF* (putative avian hemolysin), *iss* (episomal increased serum survival gene), *iroN* (salmochelin siderophore receptor gene), and *ompT* (episomal outer membrane protease gene) (Johnson et al., 2008). This PCR contained 1.25U Taq DNA polymerase (Life technologies, Rockville, MD) in 1x PCR buffer (Life technologies, Rockville, MD), 0.2mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂, and 1μM of each primer. PCR amplicons were visualized on 2.0% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). After gel electrophoresis, the images were captured using Image Capture Systems (LPixImageHE).

Statistical Analysis

Comparisons of frequencies among virulence genes in ESBL-producing and non-ESBL-producing strains were made by Pearson's Chi-square and Odds ratio test. Findings were considered to be significant where $p < 0.05$. The test was performed with the statistical program R version 3.5.1.

RESULTS

Bacterial Isolates

In all chickens carcasses tested in the southern Brazil it had been isolated 409 *E. coli* colonies. According to the antimicrobial susceptibility test, strains from chicken carcasses showed a high frequency of antimicrobial resistance, approximately 66%, in the states of southern Brazil (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul).

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobials for which strains were found to be commonly resistant included mainly tetracycline (68.77%), nalidixic acid (67.61%) and ampicillin (68.77%). We also found multidrug-resistant *E. coli* strains (Magiorakos et al., 2012) in PR, SC and

RS carcasses (82%, 53% and 80%, respectively). The ESBL phenotype was confirmed for 119 isolates (approximately 32% of PR; 31% of SC and 35% of RS) of the 409 strains isolated from commercial refrigerated chicken carcass which represents 29.1% of isolates. Of the 409 *E. coli* isolates tested, 99.3% were classified as susceptible to fosfomicin, whereas none showed intermediate resistance, and 3 (0.70%) showed resistance to fosfomicin.

Detection of antimicrobial resistance genes

In Paraná state it had been found the majority of ESBL-producing *E. coli* (32.23%) while Rio Grande do Sul was the state which was found the least number of those (27.45%). Ninety-seven out of the 119 ESBL isolates harbored the *bla*_{CTX-M} gene, 6 CTX-M-1 group, 61 CTX-M-2 group and 30 CTX-M-8 group (Table 1). The CTX-M-9 group and CTX-M-25 group was not detected in the samples. The remaining *E. coli* isolates harbored the SHV (7.56%) and TEM (10.08%) genes.

Fosfomicin resistance was identify in phenotype tests and then confirmed with PCR. The three fosfomicin resistance strains that harbored *fosA3* were *bla*_{CTX-M} positive (3.33%). PCR analysis of these 119 ESBL-producing *E. coli* isolates revealed the presence of resistance to colistin in 2.50% of them, which is one isolate from each state (PR, SC and RS). Also those strains were ESBL-producing *E. coli* and two of them harbored five virulence genes tested in this study (*iss*, *iroN*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*) and they belonged to different phylogenetic groups (A, B2 and B1).

Conjugation experiments

Among *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli* isolates tested, which belong to phylogenetic group B1, we successfully transferred their cefotaxime resistance phenotypes to the *E. coli* recipient strain J53 via conjugation onto agar.

Phylogenetic Classification

According to phylogenetic classification, the most prevalent group in all strains was the group B1 (36.6%), followed by the group A (31.7%), D (28.1%) and B2 (3.40%). The determination of *E. coli* phylogenetic groups showed that the majority of the 119 ESBL-producing isolates belonged to the phylogenetic group D (36.06%),

followed by a nearly even distribution into the remaining three phylogenetic groups, B1 (31.97%), A (27.63%) and B2 (4.22%).

Virulence Genes

E. coli harboring VF were detected throughout the strains. Among the 409 *E. coli* isolates, the prevalence of individual VF genes ranged from 33.3% (*iss*, an episomal increased serum survival gene) to 51.6% (*iutA*, an aerobactin siderophore receptor gene). We observed that 58% of ESBL-producing *E. coli* harbored three to five virulence genes (Table 1).

The highest prevalence of VF were observed in isolates which belong to CTX-M groups than the other strains that were sensible or even the strains that had other types of resistances. For each one non-ESBL strain with three or more genes, there are 2.18 ESBL strains with three or more genes (OR>1). In Paraná state for example, for *iutA* gene we had a total percentage of 54% of the presence of this gene in *E. coli* isolates and in *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli* almost 80% harbored this gene. The same was observed in the other two states and with all five genes.

TABLE 1 | Distribution of resistance, virulence genes and phylogenetic groups among 119 ESBL-producing *E. coli* isolated from chicken carcasses commercialized in Brazil.

Isolate number	β -lactamases, <i>fosA3</i> , <i>mcr-1</i> genes	Virulence genes	Phylogenetic Group
PR 2.1	Group 8 CTX-M	<i>hlyF</i> , <i>ompT</i>	A
PR 2.2	Group 8 CTX-M	<i>ompT</i>	A
PR 2.3	Group 8 CTX-M	<i>hlyF</i> , <i>ompT</i>	B1
PR 2.4	Group 8 CTX-M	<i>ompT</i>	B1
PR 2.5 T	Group 8 CTX-M	<i>ompT</i>	B1

PR 2.6 T	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT</i>	B1
PR 2.8 A	Group 8 CTX-M	<i>ompT</i>	A
PR 21.7	SHV, <i>fosA3</i>	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
PR 22.4	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
PR 22.6	Group 1 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 22.1EC	Group 1 CTX-M, Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 22.2EC	Group 2 CTX-M, Group 8 CTX-M	none	B1
PR 22.2 A	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 22 TE	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 23.5	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 28 TE	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 29.3	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	A
PR 29.5	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
PR 29 C	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
PR 30.1	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	D
PR 30.2	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	A
PR 30.6	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	A
PR 30.7	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	D
PR 32.3 A	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 33.4	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 34.2 TE	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 35.1	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
PR 35 A	Group 2 CTX-M, Group 8 CTX-M, SHV, <i>fosA3</i>	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 35 C	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
PR 35 TE	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
PR 36.3	Group 2 CTX-M, <i>mcr-1</i>	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B2
PR 37 A	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	A
PR 41.2	Group 8 CTX-M, SHV	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 41 A	Group 8 CTX-M, SHV	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 42.2	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
PR 43.1	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	D
PR 43 A	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	A
PR 44.1	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	A
PR 44.4	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	D
SC 9	Group 1 CTX-M, TEM	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
SC 18	TEM	<i>hlyF, iutA</i>	A
SC 23	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
SC 26	TEM	<i>iroN, iutA</i>	A
SC 29	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
SC 32	Group 8 CTX-M, TEM	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A

SC 33	ND ^a	<i>iss, iroN, iutA</i>	B1
SC 39	ND	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B2
SC 40	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B2
SC 42	TEM	<i>hlyF, ompT, iss, iutA</i>	D
SC 43	Group 1 CTX-M, Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iutA</i>	D
SC 45	TEM	none	A
SC 50	Group 2 CTX-M	none	A
SC 51	Group 2 CTX-M, TEM	<i>iutA</i>	A
SC 53	Group 8 CTX-M, TEM	<i>iutA</i>	A
SC 54	Group 1 CTX-M, Group 8 CTX-M, TEM	<i>iutA</i>	A
SC 56	ND	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
SC 58	TEM	<i>iutA</i>	D
SC 74	Group 2 CTX-M, TEM	<i>hlyF, ompT, iroN, iutA</i>	A
SC 76	Group 2 CTX-M, TEM	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	A
SC 123	ND	<i>iutA</i>	D
SC 125	ND	<i>iroN, iutA</i>	D
SC 129	ND	<i>iutA</i>	B1
SC 132	ND	<i>iutA</i>	B1
SC 133	ND	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
SC 136	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	B1
SC 141	ND	<i>ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
SC 146	Group 2 CTX-M	none	B1
SC 147	ND	none	B1
SC 149	ND	<i>iutA</i>	D
SC 152	ND	<i>iutA</i>	A
SC 154	ND	none	B1
SC 162	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
SC 163	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
SC 169	ND, <i>mcr-1</i>	none	B1
SC 170	ND	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
SC 175	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
SC 176	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
RS 5	Group 8 CTX-M	none	B1
RS 9	SHV	<i>ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
RS 21	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	D
RS 23	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
RS 26	Group 2 CTX-M	none	B2
RS 27	Group 2 CTX-M	<i>ompT, iss, iroN, iutA</i>	B2
RS 28	Group 8 CTX-M	<i>hlyF</i>	A
RS 34	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D

RS 58	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	A
RS 59	ND	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 95	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
RS 105	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 110	Group 8 CTX-M	none	A
RS 153	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
RS 182	Group 2 CTX-M	none	A
RS 185	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	B1
RS 200	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 201	SHV	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
RS 220	Group 2 CTX-M	<i>iutA</i>	A
RS 227	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
RS 228	SHV	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
RS 234	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 245	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iroN, iutA</i>	D
RS 247	Group 1 CTX-M	<i>iutA</i>	D
RS 294	Group 2 CTX-M	<i>iss, iutA</i>	D
RS 300	SHV, <i>mcr-1</i>	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	A
RS 306	Group 2 CTX-M	<i>iroN</i>	B1
RS 307	Group 2 CTX-M	none	A
RS 308	Group 2 CTX-M	none	B1
RS 311	Group 2 CTX-M	none	D
RS 314	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
RS 318	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
RS 324	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 332	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT</i>	D
RS 335	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	D
RS 336	SHV	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
RS 340	Group 2 CTX-M	none	A
RS 436	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iroN, iutA</i>	B1
RS 443	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN, iutA</i>	B1
RS 482	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	D
RS 516	Group 8 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	B1
RS 513	Group 2 CTX-M	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	D

^aND, not detected

DISCUSSION

In the present study 409 *E. coli* isolates from chickens' carcasses commercialized in Brazil, isolated in 2013, were investigated. According to antimicrobial resistance, we found high resistance (66%), inclusive MDR which corroborated to other countries that found MDR in Gram negative bacteria from chicken meat, as Italy (66.9%) and India (79.6%) in (Ghodousi et al., 2015; Shrestha et al., 2017). In the states of Paraná and Rio Grande do Sul were found approximately 80% of carcasses contaminated with *E. coli* resistant to three or more antimicrobials groups, and in Santa Catarina the rate was little low (53%). Those numbers demonstrated the high MDR frequency could be related to contamination of environment in aviculture industries, and to selective pressure by its indiscriminate use as prophylactic measure due to poor monitoring by regulatory bodies (Koga et al., 2015), once the prohibition of growth promoters in several countries in animal production, like poultry feeds (Brazil, Ministério da Agricultura, 2003; Brazil, Ministério da Agricultura, 2009),

Besides those antimicrobials, another concern is the presence of almost 30% isolates resistant to β -lactams in this study. Those *E. coli* have enzymes, named ESBLs, that hydrolyse the penicillins, cephalosporins, and monobactams, and are inhibited by "classical" β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam (Paterson and Bonomo, 2005). The most wide spread and common type of ESBL since the mid 2000s, identified especially in clinical isolated *E. coli* are CTX-M β -lactamases (Pitout, 2012) and now, ESBL-producing bacteria have emerged at a dramatically increasing rate in food-producing animals, such as, poultry meat (Dierikx et al., 2013; Reich, Atanassova, and Klein, 2013; Ghodousi et al., 2015; Shrestha et al., 2017). Those data are of concern since this percentage of ESBL-producing samples in carcasses (30%) were larger than ESBL-producing samples isolated of infections in the community like 27% in USA, 21% India in and 7% in Brazil (Freeman, Sexton, and Anderson, 2009; Datta et al., 2014; Gonçalves et al., 2016). From all ESBL isolates, 97% were classified as *bla*_{CTX-M} being the majority belonging to the group CTX-M-2, which differs depending the region worldwide. Recent reports describing CTX-M-1 group is also found in poultry meat in Sweden (54-58%), Belgium (62%), Canada (66.2%), Italy (8.9%) and Japan (34%) (Smet et al., 2010; Denisuik et al., 2013; Brolund et al., 2014; Ghodousi et al., 2015; Nahar et al., 2018).

While studies from Spain (Garrido et al., 2014), Portugal (Fernandes et al., 2014), Japan (Nahar et al., 2018), and Italy (Ghodousi et al., 2015) show ESBL of the CTX-M-9 group as the most prevalent one.

An important data in this study is the successful conjugation between ESBL-producing *E. coli* isolated from chicken carcass to *E. coli* recipient strain J53 which suggested that genetic determinants encoding CTX-M enzymes may have originated from animals bacteria and could be transmitted to humans bacteria via food chain (Shiraki et al., 2004; Leverstein-van et al., 2011; Xie et al., 2016). Also, it is relevant that resistance conferred by ESBLs is often associated with resistance to other classes of antibiotics, such as trimethoprim-sulfamethoxazole, aminoglycosides, and fluoroquinolone (Coque, Baquero, and Canton, 2008). Therefore, when CTX-M mobile plasmids are transferred, another resistance may be transferring together. Some studies demonstrated plasmid-mediated fosfomycin resistance has been frequently detected among CTX-M-producing isolates in animals even if this antimicrobial is not allowed in food-producing animals (Sato et al., 2013; Xie et al., 2016). In 2013, when the strains were collected, the fosfomycin use were not allowed (common) in animal producing, although we found not many positive samples of fosfomycin in this study, and 3% can prove the link between fosfomycin and CTX-M-producing isolates.

Another concern is about the usage of polymyxins (colistin) in veterinary medicine especially as feed additives, which is now prohibited in Brazil. One strain of colistin resistant *E. coli* was found in each southern Brazilian state harboring up to five virulence genes. Recently, several studies suggested the possibility of the transference of *mcr-1* gene to humans, also through food chain (Carnevali et al., 2016; Wang et al., 2017). Despite of this study does not have high percentage of this *mcr-1* gene, others studies showed high prevalence of colistin resistance may be due to the massive use of colistin in food-producing animals nowadays (Huang et al., 2017). Thus, the use of fosfomycin and colistin in food-producing animals, like in poultry, becomes a public health problem, since these antimicrobials are used in the treatment of extraintestinal infections in humans. So, just as the use of colistin was banned in animal production, the use of fosfomycin should also become.

Based on existing evidence, chickens are the source of animal food most closely linked to ExPEC in human, harboring very similar virulence genes which suggests a potential risk to cause diseases (Manges and Johnson, 2012). The more

virulence factors present in ExPEC, the greater its pathogenicity (Pitout, 2012). There is also a relationship between virulence factors and phylogenetic groups, and usually intestinal samples belong to groups A and B1, and ExPEC belong to groups B2 and D (Clermont, Bonacorsi, and Bingen, 2000). Most of carcasses samples have the presence of 3 up to 5 virulence genes tested (33-51%, varying between the five genes), belonging to phylogenetic group B1 (36%) seen as a group of commensal strains and more resistant in environment which is in accordance with other studies (Koga et al., 2015; Müller; Stephan and Nüesch-Inderbinen, 2016). Among these strains, 58% of ESBL-producing *E. coli* were found harboring three to five virulence genes. Those strains were mostly associated with phylogenetic group D, unlike non-ESBL-producing *E. coli* which belong to group B1. Those numbers are high compared to 28% of ExPEC isolated from patients mostly with UTI in southern Brazil (Cyويا et al., 2015) or even very similar to those found in APEC strains (Mohamed et al., 2018), which demonstrate that ESBL-producing *E. coli* in carcasses could be potentially pathogenic.

It is important to note that among *bla*_{CTX-M} ESBL-producing *E. coli* were found more virulence genes when compared to other strains that were sensible or even the strains that had other types of resistances ($p < 0.05$). Also, ESBL strains have 2.18 times more likely to present three to five virulence genes than non-ESBL strains, which raise the risk to become more pathogenic. Those findings raise the possibility that the *E. coli* in the intestinal tract of healthy individuals could acquire those genes from *E. coli* of chicken's meat, which could play a role as a reservoir.

Despite the importance of finding ESBL-producing *E. coli* belonging to a phylogenetic group D, group that is also found in hospital and ambulatory patients (Pietsch et al., 2017), commensal strains of group B1 are also alarming data. In this study, as well as other study (Xie et al., 2016), the transferable isolates belonged to phylogenetic group B1, demonstrating that even though they are not of the most virulent phylogenetic group (B2 or D), these strains still have virulence as well as resistance genes, making poultry meat a reservoir and possibly disseminating these elements via food chain.

CONCLUSION

The results found in this study, high frequency of virulence genes and antimicrobial resistance associated in poultry meat could be treated as a commercial issue whereas Brazil is the second major producer of chicken meat in the world. Another concern is public health problems since poultry meat could role as reservoir and possibly disseminating those elements via food chain. And for future studies it would be important to observe whether both factors studied, resistance and virulence, are transferred together to other bacteria, showing to be together in the same plasmid.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES). Thanks are also due to Fundação Araucária for the use of financial facilities (Chamada Pública CP 09/2016 - Protocol 10748).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interests.

REFERENCES

Arlet, G., and G. Philippon. (1991). Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamase (TEM, SHV, CARB) [corrected]. *FEMS Microbiology Letters*. 66, 19–25.

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

Brasil Ministério da Agricultura, “Pecuária e Abastecimento. 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, no. 9, 2003 (Portuguese), http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009-2003%20%20Proibe%20uso%20de%20cloranfenicol%20e%20nitrofuranos.

Brasil Ministério da Agricultura. Pecuaria e Abastecimento, “Regulamento tecnico para a fabricacao, o controle de qualidade, a comercializacao e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinario,” Instrucao Normativa 26, Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento, Brasilia, Brazil, 2009 (Portuguese), <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>

Brolund, A., Edquist, P.J., Makitalo, B., Olsson-Liljequist, B., Soderblom, T., Wisell, K.T., and Giske, C.G. (2014). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 344–352.

Carnevali, C., Morganti, M., Scaltriti, E., Bolzoni, L., Pongolini, S., and Casadei, G. (2016). Occurrence of mcr-1 in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from humans and animals in Italy, 2012 to 2015. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7532–7534.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-838-X [Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.

Coque, T.M., Baquero, F., and Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 13, 19051.

Cyoia, P.S., Rodrigues, G.R., Nishio, E.K., Medeiros, L.P., Koga, V.L., Pereira, A.P., Vespero, E.C., Houle, S., Dozois, C.M., Nakazato, G., Kobayashi, R.K. (2015). Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 9, 1068-75.

D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G.M. (2013). CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 303, 305–317.

Datta, P., Gupta, V., Sidhu, S., Chander, J. (2014). Community Urinary Tract Infection due to ESBL producing *E. coli*: epidemiology and susceptibility to oral antimicrobials including Mecillinam. *Nepal Journal of Medical sciences.* 3, 5-7.

Denisuik, A.J., Lagace-Wiens, P.R., Pitout, J.D., Mulvey, M.R., Simner, P.J., Taylor, F., Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., Adam, H.J., and Zhanel, G.G. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum betalactamase., AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, i57–65.

Dierikx, C.M., van derGoot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., and Mevius, D. (2013). Extended-spectrum- β -lactamase and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 68, 60–67.

Fernandes, M. R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., Lopes, R., Otutumi, L. K., Goncalves, D. D., Dropa, M., Matte, M. H., Monte, D. F., Landgraf, M., Francisco, G. R., Bueno, M. F., de Oliveira Garcia, D., Knobl, T., Moreno, A. M., and Lincopan, N. (2016). Silent dissemination of colistin resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 21, 30214.

Fernandes, R., Amador, P., Oliveira, C., and Prudencio, C. (2014). Molecular characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in northern Portugal. *Sci. World J.* 782897.

Freeman, J.T., Sexton, D.J., and Anderson, D.J. (2009). Emergence of Extended-Spectrum b-Lactamase–Producing *Escherichia coli* in Community Hospitals throughout North Carolina: A Harbinger of a Wider Problem in the United States?. *Clinical Infectious Diseases.* 49, 30–32.

Garrido, A., Seral, C., Gude, M.J., Casado, C., Gonzalez-Dominguez, M., Saenz, Y., Castillo, F.J. (2014). Characterization of plasmid-mediated beta-lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain. *Microb. Drug Resist.* 20, 301–304.

Ghadousi, A., Bonura, C., Di Noto, A.M., and Mammina, C. (2015). Extended-Spectrum B-lactamase, AmpC-producing and fluoroquinolone-resistant *E. coli* in retail broiler chicken meat, Italy. *Foodborne Pathogens and disease.* 12, 619.

Gonçalves, L.F., Martins-Junior, P.O., Melo, A.B.F., Silva, R.C.R.M., Martins, V.P., Pitondo-Silva, A., Campos, T.A. (2016). Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 6, 1-4.

Giancola, S.E., Mahoney, M.V., Hogan, M.D., Raux, B.R., McCoy, C., and Hirsch, E.B. (2017). Assessment of Fosfomycin for complicated or multidrug-resistant urinary tract infection: patient characteristics and outcomes. *Chemotherapy.* 62, 100-104.

Ho, P.L., Chan, J., Lo, W. U., Law, P. Y., Li, Z., Lai, E. L., and Chow, K. H. (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance *fosA3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *J Appl Microbiol.* 114, 695–702.

Huang, X., Yu, L., Chen, X., Zhi, C., Yao, X., Liu, Y., Wu, S., Guo, Z., Yi, L., Zeng, Z. and Liu, J.H. (2017). High Prevalence of Colistin Resistance and *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in China. *Front. Microbiol.* 8, 562.

Jacoby, G. A. and Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology.* 34, 908–911.

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Stell, A.L., Doetkott, C. et al. (2008). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 74, 7043–7050.

Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., and Nolan, L. K. (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology.* 46, 3987–3996.

Koga, V. L., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., de Brito, B. G., de Brito, K. C. T., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. T. (2015). Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* isolated from Conventional and Free-Range Poultry. *BioMed Research International*, 2015, 1–8.

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., Mevius, D.J. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 17, 873–880.

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., and 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. *Lancet Infect Dis.* 16, 161–8.

Manges, A. R., and Johnson, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis.* 55, 712-9.

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18, 268-81.

McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., and Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 4420-1.

Mohamed, L., Zhao, G., Li, Y., Gao, Y., Kaidi, R., Oumouna, M., Wang, J., Oumouna, K. (2018). Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria. *Trop Anim Health Prod.* 50, 547–553.

Müller, A., Stephan, R., and Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment.* 541, 667–672.

Nahar, A., Awasthi, S.P., Hatanaka, N., Okuno, K., Hoang, P.H., Hassan, J., Hinenoya, A., and Yamasaki, S. (2018). Prevalence and characteristics of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *Journal of veterinary medical science.* 80, 510-517.

Pietsch, M., Eller, C., Wendt, C., Holfelder, M., Falgenhauer, L., Fruth, A., Grössl, T., Leistner, R., Valenza, G., Werner, G., and Pfeifer, Y. (2017). Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Veterinary Microbiology*. 200, 130-137. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.028

Rapoport, M., Faccone, D., Pasteran, F., Ceriana, P., Albornoz, E., and Petroni, A. (2016). First Description of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: first description in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 60, 4412-3.

Reich, Atanassova, V., and Klein, G. (2013). Extended-spectrum β -lactamase- and ampc-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 19, 1253–1259.

Sato, N., Kawamura, K., Nakane, K., Wachino, J., and Arakawa, Y. (2013). First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb Drug Resist*. 19, 477–482.

Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., and Arakawa, Y. (2004). *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis*. 10, 69–75. doi: 10.3201/eid1001.030219.

Shrestha, A., Bajracharya, A.M., Subedi, H., Turha, R.S., Kafle, S., Sharma, S., Neupane, S., and Chaudhary, D.K. (2017). Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Research Notes*. 10, 574.

Skov, R.L., and Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill*. 21, 30155.

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Claeys, G., Lontie, M., Van Meensel, B., Herman, L., Haesebrouck, F., and Butaye, P. (2010). Characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. *Microb. Drug Resist.* 16, 129–134.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 8, 207–217.

Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Wu, Z., Yin, W., Schwarz, S., et al. (2017). Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat. Microbiol.* 2, 16260. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.260.

Woodford, N., E. J. Fagan, and M. J. Ellington. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 57, 154–155.

Xie, M., Lin, D., Chen, K., Chan, E.W.C., Yao, W., and Chen, S. (2016). Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Retail Meat That Harbor *bla*CTX-M and *fosA3* Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 60, 2450-2455.

Zeng, K. J., Doi, Y., Patil, S., Huang, X., and Tian, G. B. (2016). Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 3862-3.

6. CONCLUSÕES

- Foram isoladas e identificadas *E. coli* nas carnes de frango estudadas.
- Apesar da proibição do uso de alguns antimicrobianos como promotor de crescimento e medidas regulatórias, muitos isolados de *E. coli* das carcaças de frangos ainda apresentaram resistência aos B-lactâmicos, colistina e a fosfomicina, assim como resistências a outras classes de antimicrobianos, identificados molecular e fenotipicamente.
- Além disso, notou-se a presença de maior resistência nos isolados ESBL do que nos não-ESBL.
- Enfim, identificou-se uma alta frequência de genes de virulência e resistência combinados nos isolados de *E. coli* de carnes de frangos, mostrando ainda que os isolados ESBL apresentaram mais genes de virulência que os não-ESBL.
- Assim, esses achados podem ser considerados um risco zoonótico, visto que estas carnes podem ser um possível reservatório de genes que possivelmente serão disseminados via cadeia alimentar, se tornando um risco para a saúde pública.