



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MAYSA CHUEIRI MIRANDA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL MULTIRRESISTENTES  
CAUSADORAS DE COLIBACIOSE NA CADEIA DE  
PRODUÇÃO AVÍCOLA**

---

Londrina  
2017

MAYSA CHUEIRI MIRANDA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL MULTIRRESISTENTES  
CAUSADORAS DE COLIBACIOSE NA CADEIA DE  
PRODUÇÃO AVÍCOLA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Angelita Sampaio Baptista

Londrina  
2017

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

Miranda, Maysa Chueiri.

Investigação de genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal multirresistentes causadoras de colibacilose na cadeia de produção avícola / Maysa Chueiri Miranda. - Londrina, 2017.  
65 f. : il.

Orientador: Renata Takayama Katsuko Kobayashi.

Coorientador: Ana Angelita Sampaio Baptista.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Enterobactérias - Tese. 2. ExPEC - Tese. 3. Resistência bacteriana - Tese. I. Kobayashi, Renata Takayama Katsuko. II. Baptista, Ana Angelita Sampaio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

MAYSA CHUEIRI MIRANDA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL MULTIRRESISTENTES  
CAUSADORAS DE COLIBACIOSE NA CADEIA DE  
PRODUÇÃO AVÍCOLA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko  
Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

Londrina, 17 de fevereiro de 2017

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me proporcionado alcançar mais um sonho em minha vida, por me manter forte quando eu mais precisava, sempre me guiando, e sem me permitir perder a fé. Agradeço também a Ele por ter colocado tantas pessoas maravilhosas no meu caminho que foram essenciais para chegar até aqui:

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata T. K. Kobayashi por ter me dado uma oportunidade e me recebido tão bem no laboratório, por ser uma pessoa maravilhosa, amiga, professora dedicada e atenciosa. Obrigada por todos os ensinamentos, sugestões e orientação, e carinho durante esses dois anos. Sua calma e confiança em mim foram especiais em meu percurso e em minha vida. Sou muito grata!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Angelita Sampaio Baptista pela co-orientação, por todo o apoio e ajuda com meu trabalho. Desde o começo se fez presente com a coleta das amostras, pelo delineamento dos resultados, por me auxiliar com todas as dúvidas, as correções, as sugestões, e a carinhosa atenção. Tudo isso fez toda a diferença em meu trabalho. Sem você não teria conseguido chegar até aqui e obtido os resultados que alcancei. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, por toda a ajuda durante o Mestrado, estar sempre disponível quando necessário, por todas as sugestões, pelas correções no trabalho, pela presença na banca de qualificação e por estar sempre ajudando e nos estimulando pela busca de conhecimento, sempre com alegria.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Vespero, que me acompanha já faz um longo tempo, que me abriu as portas e o coração para a pesquisa, que me abraçou como orientanda de IC e me fez me apaixonar pela Microbiologia. Agradeço imensamente pela ajuda em meu trabalho, com as sugestões de técnicas, por me fornecer primers quando foi necessário, por todas as correções dos trabalhos e do artigo, e por estar sempre presente em momentos importantes como a defesa do plano, a qualificação e a defesa do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oba, por toda a colaboração neste trabalho, pela doação das amostras dos frangos da Fazenda Escola, por sanar todas as minhas dúvidas quando foi necessário e pela ajuda com a correção e participação na defesa de plano.

Agradeço imensamente aos meus colegas Vanessa Lumi Koga, Leonardo Medeiros, Larissa Ciappina de Camargo, Juan J. P Sarmiento e Erick Nishio pela ajuda com o meu trabalho. Todos vocês contribuíram em diferentes etapas, mas foram essenciais para que esse sonho também se concretizasse.

Aos meus amigos do laboratório NIP3, que me acolheram como se eu fizesse parte há muitos anos e me tornaram parte dessa família maravilhosa, unida e feliz. Mesmo com as adversidades do dia a dia e os problemas que enfrentamos, nunca perdemos a vontade de continuar. Admiro muito todos vocês, desejo todo o sucesso do mundo e obrigada por todos esses dias felizes.

Aos meus pais Eduardo e Claudia, ao meu irmão Eduardo Filho, e a minha família, agradeço imensamente por estarem ao meu lado, sempre me incentivando e torcendo por mim. Vocês me educaram com amor, se dedicaram à minha educação como ser humano, me deram amor. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer.

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

Muito obrigada a todos!

MIRANDA, Maysa Chueiri. **Investigação de genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal multirresistentes causadoras de colibacilose na cadeia de produção avícola.** 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina; Londrina, 2017.

## RESUMO

A produção brasileira de carne de frango destaca-se no cenário do agronegócio. Em decorrência do sistema intensivo de produção, os aspectos sanitários são um desafio ao setor. O uso de antimicrobianos na produção tem levado a seleção de bactérias resistentes. *Escherichia coli* faz parte da microbiota normal de mamíferos e aves, porém algumas cepas podem causar doenças em humanos e animais dependendo de seu perfil de virulência. *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) é agente da colibacilose, doença que acarreta altas perdas econômicas para indústria avícola. Este trabalho teve como objetivo a investigação de um surto de colibacilose aviária. Foram selecionadas 60 amostras bacterianas, sendo 14 APECs isoladas de frangos de corte acometidos por colibacilose, 15 amostras de *E. coli* pertencentes à microbiota intestinal de frangos saudáveis, 22 provindas da cama de aviário e nove amostras do galpão de criação. Foram analisados quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos e os testes de susceptibilidade mostraram alta frequência de resistência a quase todos os compostos testados, com 67% das amostras multirresistentes. Uma exceção foram as fluorquinolonas, onde 98.4% das amostras permaneceram sensíveis. Das 60 amostras, 47 eram *E. coli* produtoras de ESBL. O grupo de genes do tipo CTX-M-1 foi o mais frequente encontrado associado com o fenótipo ESBL, e somente uma amostra (1.6%) pertencente à cama de frango apresentou positividade para o gene *mcr-1*. A classificação filogenética mostrou que os grupos D e A foram predominantes e entre os genes de virulência, o gene *iutA* foi o prevalente (71.6%). A clonalidade entre as amostras foi investigada por meio de Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences (ERIC-PCR), mostrando que as amostras foram agrupadas em quatro grupos clonais, com alta variabilidade genética entre elas. Estes resultados mostram que as aves e o ambiente de criação podem ser possíveis reservatórios de genes de virulência e resistência, com possibilidade de transferência genética entre micro-organismos durante a produção, e conseqüentemente risco zoonótico, sendo de grande importância na avicultura à elaboração de programas de monitoramento da presença desses genes e o uso racional de antimicrobianos para minimizar o aparecimento de doenças e a disseminação de cepas multirresistentes.

**Palavras-chave:** *escherichia coli*; colibacilose aviária; multirresistência; ESBL; fatores de virulência.

MIRANDA, Maysa Chueiri. **Investigation of resistance and virulence genes in strains of multiresistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing colibacillosis in the avian production chain.** 2017. 65 p. Dissertation (Microbiology Master) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The Brazilian chicken meat production stands out in the agribusiness scenario. Because of the intensive production system, the health aspects are a challenge to the sector. The use of antimicrobials in chicken production has led to the selection of resistant bacteria. *Escherichia coli* are part of the normal mammalian and avian microbiota and can cause diseases in both humans and animals depending on their virulence profile. Bird pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is an agent of colibacillosis, a disease that causes high economic losses to the poultry industry. The aim of this study was to investigate the profiles of antimicrobial resistance, virulence genes and verify the clonality of *E. coli* strains. To this, were available sixty bacterial isolates, being fourteen APEC isolates from chickens affected by colibacillosis, fifteen *E. coli* isolates from the microbiota of healthy broiler chickens, twenty-two from the poultry litter and nine isolates from the poultry house. These were analyzed for the verify the antimicrobial resistance profile, including extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) phenotype and the resistance to colistin (gene *mcr-1*), phylogenetic classification, beta-lactams resistance genes and the presence of virulence genes, and also the clonality between the strains through Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences (ERIC-PCR). Phylogenetic classification showed that groups D and A were more frequent and among virulence genes, the *iutA* gene was the most prevalent (71.6%). Antimicrobial susceptibility testing showed a high frequency of resistance to almost all compounds tested, with 67% of the isolates multiresistant. An exception was the fluoroquinolones, where 98.4% of the isolates remained sensitive. Among the sixty strains, 47 (78.3%) isolates were *E. coli*- producing ESBL. The group of CTX-M-1 type genes was the most frequently found associated with the ESBL phenotype, and just one sample (1.6%) of poultry litter showed positivity for *mcr-1* gene. The ERIC-PCR analysis showed that the isolates were group into four clonal groups, showing low clonality between them. These results shows that avian and the breeding environment may be possible reservoirs of virulence and resistance genes, with the possibility of genetic transfer between microorganisms during production and consequently zoonotic risk, being of great importance in the poultry production the development of programs that monitor the presence of these genes and apply the rational use of antimicrobials to minimize the onset of diseases and the spread of multiresistant strains.

**Key words:** *escherichia coli*; avian colibacillosis; multiresistance; ESBL; virulence factors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
APC	Antimicrobianos Promotores de Crescimento
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>E. coli</i> de adesão difusa
UPEC	<i>E. coli</i> Uropatogênicas
MNEC	<i>E. coli</i> associadas a Meningites Neonatais
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
SEPEC	<i>E. coli</i> causadoras de Sepsis
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MLST	Multilocus Sequence Typing

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1	A AVICULTURA NO BRASIL .....	13
2.2	USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO AVIÁRIA .....	13
2.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	15
2.4	<i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICA EXTRAINTestinal (ExPEC) .....	16
2.4.1	<i>Escherichia Coli</i> Patogênica Para Aves (APEC) .....	16
2.5	COLIBACILOSE AVIÁRIA .....	18
2.6	RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS .....	18
2.6.1	Beta-Lactamases De Espectro Estendido (ESBLs) .....	19
2.6.2	AmpC.....	21
2.6.3	Beta-Lactamases Na Avicultura .....	22
2.7	RISCO ZONÓTICO.....	23
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	36
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil vem atingindo níveis cada vez maiores tanto de exportação, onde é líder mundial desde 2011, como em produção, onde ocupa o segundo lugar. Em 2015, a produção mundial do produto chegou a 13,14 milhões de toneladas e o consumo per capita foi de 43,25 Kg/Hab. Os estados da região Sul destacam-se como os maiores produtores e juntos chegam a 63% da produção brasileira, sendo o estado do Paraná o maior produtor nacional (ABPA, 2016). Devido ao crescimento acelerado e o aprimoramento das tecnologias industriais, a produção intensiva acabou levando a condições que colocam em risco a saúde das aves.

Dentre os agentes que causam infecções nas aves pode-se destacar *Escherichia coli*, que apesar de pertencer a microbiota intestinal normal, pode ser um importante patógeno, uma vez que apresente fatores de virulência, que tornam-os capazes do desenvolvimento de infecções.

*E.coli* patogênica pode ser classificada em dois grupos: diarreiogênicas, causando infecções intestinais em mamíferos e as patogênicas extraintestinais (ExPECs), que causam infecções em diferentes sítios, como trato urinário, corrente sanguínea, meningites, entre outras (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A capacidade de causar infecções extraintestinais depende da presença de fatores de virulência que permitem a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. A colibacilose aviária é uma doença causada por um tipo de ExPEC chamada de *E.coli* patogênica para aves (APEC), a qual promove relevantes prejuízos econômicos ao setor avícola (KOBAYASHI et al., 2011), causando quadros de celulite, aerossaculite, peri-hepatite, sepsis entre outros (BONNET et al., 2009).

Dentre as práticas de biossegurança adotadas na produção avícola, está a utilização de antimicrobianos na alimentação com o objetivo de atuarem como promotores de crescimento (APC), visando à melhoria no desempenho dos animais e limitando o crescimento indesejável de micro-organismos patogênicos. Estes diferem dos antibióticos utilizados com a função terapêutica, que tem o objetivo de controle das infecções e a eliminação de patógenos nos animais (ARIAS; CARRILHO, 2012). Porém, o uso persistente destes compostos vem acarretando a seleção de cepas multirresistentes (JIANG et al., 2011). No Brasil o uso de APCs é proibido em produtos destinados à exportação, especialmente para União Européia, que restringiu o uso dessas substâncias e segue uma fiscalização rígida. Já para a produção de carne destinada ao consumo interno ainda é permitido a utilização de algumas classes de APCs (BRASIL, 2009).

Diversos estudos tem demonstrado uma maior taxa de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos em *E. coli* provindas de frangos de corte em relação a amostras bacterianas isoladas de galinhas poedeiras e de outros produtos derivados de animais de produção, como

carne bovina ou suína (PERSOONS et al., 2012; SHEIKH et al., 2012). Dentre os mecanismos de resistência, um dos mais encontrados em *E. coli* é a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) (PITOUT, 2012a). Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento significativo na detecção de bactérias produtoras de ESBL em carne de frango em diferentes países (KOGA, 2015a, 2015b; SÓLA-GINES, 2015; GERSER, 2012). Acredita-se que os frangos de corte podem ser reservatórios de cepas patogênicas e multirresistentes transmitindo-as para os humanos, tornando essa situação extremamente grave e de importância global (SEIFFERT et al., 2013a).

Apesar das tentativas de fiscalização e padronização quanto ao acesso e uso de antimicrobianos na produção animal, a utilização destes produtos acaba não sendo devidamente monitorada. É primordial que haja maior regulamentação do uso desses fármacos na produção agropecuária e avícola e também que medidas sejam exigidas visando à contenção de surtos de colibacilose por bactérias multirresistentes e para diminuir a disseminação de enteropatógenos por alimentos de origem animal (ARIAS; CARRILHO, 2012).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Avicultura no Brasil**

O Brasil é atualmente o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango do mundo (ABPA, 2016), atrás somente dos Estados Unidos. O crescimento desta área vem sendo impulsionado pelo aumento do mercado interno, através do consumo per capita (ABPA, 2014) e pela alta taxa de exportações, especialmente para o Oriente Médio e Ásia. Em 2016 os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul se mantiveram como os maiores produtores, dominando o cenário neste setor (SINDIAVIPAR, 2014; ABPA, 2016).

No início, por volta da década de 1960, a avicultura brasileira era mantida por produtores familiares, voltada para a subsistência, como uma atividade para geração de renda e composta principalmente por linhagens “caipiras” e produção de ovos (CNA, 2015). O processo de industrialização e a produção em larga escala, aliados ao desenvolvimento das cidades, o aumento populacional e o desenvolvimento da genética, permitiram o grande avanço e expansão da avicultura no Brasil (UBABEF, 2011).

Nos últimos anos, a utilização de tecnologia avançada, controle sanitário às normas internacionais e taxa de câmbio favorável às exportações contribuíram para que o país alcançasse bons resultados e aumentasse a sua vantagem competitiva no mercado exterior, resultando no crescimento significativo da produção (IBGE/SIDRA, 2013).

### **2.2 Uso de antimicrobianos na produção avícola**

O mercado de avicultura almeja altas taxas de produtividade, sendo dependente de vários fatores como a nutrição, boas práticas no manejo e as técnicas de biossegurança (LINZMEIER, 2009). Com o intenso aumento do consumo de carne de frango, para se alcançar uma produção satisfatória, além de várias outras alternativas, faz-se necessário a aplicação de estratégias nutricionais. Dentre estas, tem-se uso de antimicrobianos, que podem ser adicionados na água e/ou na ração, com finalidades terapêuticas e como aditivos promotores de crescimento (REIS, 2012), para melhorar a eficiência e conversão alimentar e consequentemente desempenho e crescimento dos animais (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; NORMANNO, 2007).

O uso de antimicrobianos como aditivos proporciona: a) melhor eficiência alimentar, b) conservação microbiológica das rações, c) aumento de produtividade d) diminuição no consumo de alimentos pelos animais até o abate, e) prevenção do aparecimento de doenças infecciosas clínicas e subclínicas f) menores taxas de mortalidade (ALBUQUERQUE, 2005), contribuindo

assim para reduzir os custos com a produção e aumentando a rentabilidade (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

Em animais de produção, os antimicrobianos são utilizados com função terapêutica para tratar infecções gastrintestinais, respiratórias, cutâneas e reprodutivas (ARIAS; CARRILHO, 2012), e as principais classes utilizadas são anfenicóis, tetraciclina, beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 2009). A maior preocupação com o uso de antimicrobianos com essa finalidade na Medicina Veterinária consiste no fato de que muitos fármacos pertencem às mesmas classes de antimicrobianos usados em seres humanos (ARIAS; CARRILHO, 2012).

Como promotores de crescimento, estes compostos regulam a microflora gastrintestinal, limitando a presença de bactérias indesejáveis, possivelmente patogênicas, favorecendo um ambiente para o desenvolvimento de micro-organismos benéficos (FLEMMING; FREITAS, 2005) através da diminuição da produção de toxinas e aumento do fornecimento de nutrientes para as bactérias favoráveis, aumentando a disponibilidade para o animal, maior produção de vitaminas, menor produção de amônia no intestino melhorando a conversão e o consumo de energia, digestão facilitada dos alimentos e o metabolismo dos nutrientes (LINZMEIER et al., 2009). Todavia, é fundamental reforçar que o uso de APC não substitui as práticas de biossegurança nas granjas (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

Atualmente, os aditivos antimicrobianos autorizados no Brasil e utilizados para a carne destinada ao consumo interno são: Oligossacarídeos (avilamicina), polipeptídeos (bacitracina de Zinco), glicopeptídeos (enramicina), macrolídeos (espiramicina), quinolinas (halquinol), lincosamida (lincosamida), estreptogramina (virginiamicina) (MAPA, 2015). No entanto, deve-se ressaltar a possibilidade desses compostos serem análogos ou apresentarem resistência cruzada com os antimicrobianos de uso terapêutico na clínica humana (PALERMO; SPINOSA; GORNIK, 2005).

Estima-se que 50% dos antimicrobianos produzidos no mundo sejam destinados a medicina humana e a outra fração seja aplicada no controle de pragas agrícolas, tratamento de doenças em animais e promotores de crescimento (ARIAS; CARRILHO, 2012; MATEU; MARTIN, 2001; MOTA et al., 2005; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

Um importante problema de saúde pública decorrente do uso frequente e descontrolado de antimicrobianos na cadeia de produção é a seleção de bactérias multirresistentes e o fato de que esses micro-organismos podem ser transmitidos aos seres humanos através do ambiente por contato direto (DIERIKX et al., 2013b) e dos trabalhadores agrícolas (GRAHAM et al., 2009), ou indireto através dos alimentos (PRICE et al., 2005). Diversos estudos já relataram que a administração de antimicrobianos a aves aumentou o risco de seleção de bactérias resistentes

comparado ao não tratamento com esses compostos (DA COSTA et al., 2008; DHEILLY et al., 2013; DIARRA et al., 2007; SIMONEIT et al., 2015).

A resistência bacteriana pode ser associada à ampla utilização dos antimicrobianos, sendo intensificada pelo uso prolongado de concentrações subterapêuticas. Diversos mecanismos de resistência podem estar presentes nos micro-organismos, dentre eles a alteração do sítio de ação, degradações e modificações enzimáticas, bombas de efluxo e alterações da permeabilidade. Estes podem ocorrer devido a modificações genéticas que levam a mutações espontâneas do DNA ou através da introdução de DNA exógeno, por meio de mecanismos como transformação e/ou conjugação, em que elementos genéticos móveis (transposons e plasmídeos) carreadores de genes de resistência são transferidos entre bactérias (LIVERMORE, 2003).

Desde 1998, e fundamentado pela Instrução Normativa Nº 9, de 27 de junho de 2003 está proibido o uso de avoparcina, cloranfenicol, penicilinas, tetraciclínas, e sulfonamidas como promotores de crescimento no Brasil (BRASIL, 1998; 2003).

Atentando-se às diversas preocupações e casos descritos sobre o aparecimento de cepas resistentes aos antimicrobianos tanto em animais como humanos, a União Europeia (UE) foi radical em rever o uso de fármacos com essa função e desde 2006 está proibido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento nesses países (CASTANON, 2007). Portanto, para a carne destinada à exportação, o Brasil necessitou acatar as normas e adaptar a sua forma de produção para atender as novas necessidades, exigências e critérios (ALLIX, 2010).

O sulfato de colistina era um dos compostos autorizados no Brasil como aditivos zootécnicos em animais de produção. Com o recente aparecimento de casos de resistência a colistina mediada por plasmídeos, por meio do gene *mcr-1*, tanto em animais como humanos (LIU et al., 2016), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atendeu as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e proibiu o uso dessa substância como promotor de crescimento em todo o país devido ao seu impacto na saúde humana (BRASIL, 2016). A colistina faz parte da classe das polimixinas, e na clínica humana é atualmente umas das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por Enterobactérias produtoras de carpabenemases (LIU et al., 2016).

### **2.3 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, que pertence à família Enterobacteriaceae com metabolismo anaeróbico facultativo. Possuem a capacidade de fermentar, podem ser móveis ou imóveis, não esporulam e são oxidase negativo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Fazem parte da microbiota intestinal normal de humanos e também de outros animais homeotérmicos incluindo as aves. Nestes animais, *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal, sendo consideradas

bactérias comensais (LEV; BRIGGS, 1956) e também o trato respiratório superior (traqueia e faringe) (GUABIRABA; SCHOUER, 2015). Entretanto, alguns isolados possuem fatores de virulência, podendo torná-los patogênicos.

*E.coli* patogênica pode ser dividida em dois grupos: as que causam infecções intestinais, as chamadas cepas diarreio gênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* produtora de Shiga-Toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY. 2004) e as cepas de *Escherichia coli* patogênica extraintestinais (ExPEC), capazes de causar infecções em outros sítios em humanos como as *E.coli* uropatogênicas (UPEC), *E.coli* associadas a meningites neonatais (MNEC), as *E.coli* causadoras de sepse (SEPEC) (BÉLANGER et al., 2011), e também a *E. coli* patogênica aviária (APEC) responsável por infecções em aves (EWERS et al., 2007).

#### **2.4 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal**

As ExPECs são muito estudadas e são caracterizadas pela presença de diversos fatores de virulência que as diferem das cepas comensais e *E. coli* diarreio gênicas. Na classificação filogenética o patótipo é inserido nos grupos B2, em alguns casos no grupo D e também F, enquanto cepas comensais pertencem principalmente ao grupo A, B1 e atualmente grupo C (CLERMONT et al., 2013; JOHNSON et al., 2008).

A patogenicidade em ExPECs é regulada pela presença de uma variedade de fatores de virulência, como toxinas, adesinas, lipopolissacarídeos, presença de cápsula, proteases, invasinas, dentre outros, que permitem a colonização e sobrevivência em ambientes fora do epitélio intestinal e estão geralmente inseridos em ilhas de patogenicidade ou outras estruturas móveis de DNA (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; PITOUT, 2012b). A presença de genes que expressam fatores de virulência somados a eventos multifatoriais do hospedeiro e do agente bacteriano podem culminar na manifestação de doenças.

##### **2.4.1 *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)**

*E. coli* patogênica para aves (APEC) é um subgrupo de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NAKAZATO et al., 2009). A presença de fatores de virulência pode levar a um potencial patogênico nessas cepas e o aparecimento de infecções, tal como a colibacilose aviária. De acordo com Johnson et al. (2008), a caracterização genotípica dos isolados de APEC pode ser feita através da detecção de um conjunto de cinco genes de virulência mais frequentes nestes patótipos, carregados por um plasmídeo de virulência, chamado ColV (GUABIRABA; SCHOUER, 2015; JOHNSON et al., 2008; KOGA et al.,

2015b). Estes genes podem ser utilizados para diferenciar *E.coli* das linhagens comensais e diarreio gênicas, e incluem as proteases (*ompT*), proteínas resistentes a ação lítica do soro (*iss*), expressão de hemolisina (*hlyF*) e sistema de captação de ferro (*iutA*, *iroN*) (GUABIRABARA; SCHOULER, 2015). Alguns estudos relatam ainda que outro gene frequentemente encontrado nas linhagens de APEC é o da hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) (DOZOIS et al., 2000; EWERS et al., 2007), sendo, portanto de extrema importância sua investigação.

Um destes fatores de virulência que permite a sobrevivência do patógeno no hospedeiro é o gene *iss*, que pode levar a evasão do sistema imunológico devido a um mecanismo de resistência lítica ao soro. Este gene codifica proteínas de membrana externa que bloqueiam a ligação do sistema complemento, impedindo assim a lise bacteriana (DZIVA; STEVENS, 2008). Este gene foi descrito pela primeira vez em *E. coli* humana, em conjunto com o plasmídeo ColV, justamente pela sua capacidade de conferir resistência sérica (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982). Acredita-se que ele tenha um importante papel na virulência em APEC, já que diversos estudos relatam maior frequência nestes tipos de cepas do que as isoladas de frangos saudáveis (VIDOTTO et al., 1990; NOLAN et al., 2003; MCPEAKE; SMYTH; BALL, 2005).

Os fatores envolvidos na aquisição de ferro (*iutA*; *iroN*) também são extremamente importantes para a sobrevivência dos patógenos. O ferro é um cofator essencial para o metabolismo bacteriano, porém, no hospedeiro está presente no plasma e ligado a diversos tipos de proteínas carreadoras como transferrinas ou proteínas do tipo heme, diminuindo sua disponibilidade. Devido a isso, é necessária a presença de compostos que tem alta afinidade com o ferro, chamados de sideróforos (como aerobactina e salmoquelina principalmente) que são quelantes e captadores de ferro, permitindo a retirada desta molécula das proteínas, o sequestro e utilização pelas bactérias (DZIVA; STEVENS, 2008).

Entre as proteases encontradas em *E. coli* temos a do tipo *ompT*, a hemolisina do tipo F, e a hemaglutinina *tsh*. A proteína que codifica o gene *ompT*, está presente na membrana externa da bactéria, e requer um lipopolissacarídeo da membrana para sua atividade. Esse gene tem a capacidade de ativar plasminogênio e hidrolisar peptídeos com atividade antimicrobiana (JOHNSON et al., 2008).

A hemolisina é uma proteína formadora de poros na membrana de células, podendo lisar eritrócitos, leucócitos, fibroblastos, granulócitos, levando a morte celular e aumentando a disponibilidade do íon ferro para o micro-organismo (JOHNSON et al., 2008; KOGA et al., 2015b). O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em amostras de APEC por ser uma hemolisina aviária, embora também já tenha sido encontrada em amostras de ExpEC humanas (PEIGNE, C. et al., 2009)

Já a hemaglutinina temperatura sensível, codificada pelo gene *tsh* faz parte de um grupo de proteínas autotransportadoras e foi identificada pela primeira vez a partir de amostras de APEC causando aerossaculite e colisepticemia em aves (PROVENCE; CURTISS, 1992). Esta auxilia na atividade proteolítica degradando hemoglobina. Estudos diversos sobre essa protease vêm relatando que ela pode estar mais associada com virulência nas amostras de APEC em relação a *E. coli* isoladas da microbiota (DOZOIS et al., 2000; KOBAYASHI; GAZIRI; VIDOTTO., 2010).

## **2.5 Colibacilose aviária**

A presença dos fatores de virulência favorecem o desenvolvimento da infecção e consequentemente a manifestação da doença, colibacilose, que é capaz de afetar aves em todas as idades e acarreta significativas perdas econômicas para a indústria avícola (GUABIRABA; SCHOULER, 2015).

Outras doenças como micoplasmose, coccidiose aviária, Doença de Newcastle, Bronquite infecciosa das galinhas e limitações nutricionais pode predispor os animais a infecções por APEC (WRAY; DAVIES, 1996)

As linhagens de APEC podem se disseminar através de diferentes órgãos, colonizando especialmente o epitélio respiratório das aves (traqueia, sacos aéreos e pulmões) causando lesões fibrino-purulentas em órgãos internos, levando a manifestações respiratórias, celulite, pericardite, aerossaculite, peri-hepatite, peritonite, onfalite, infecções no saco vitelínico e alcançar a circulação sanguínea promovendo quadros septicêmicos levando a altas taxas de mortalidade em aves jovens (OH et al., 2011).

A profilaxia desta doença se baseia no controle rígido das condições de reprodução das aves e práticas de biosseguridade. A terapia imunológica é menos efetiva e menos utilizada do que as outras medidas, pois as cepas de APEC são extensamente diversas e devido a grande variedade de sorogrupos presentes no ambiente (SADEYEN et al., 2015).

O tratamento da colibacilose baseia-se no uso de compostos antimicrobianos para eliminar o patógeno, porém este pode estar se tornando ineficaz e insuficiente devido ao aumento do número de *E. coli* multirresistente aos antimicrobianos (GUABIRABA; SCHOULER, 2015).

## **2.6 Resistência aos beta-lactâmicos**

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são as drogas mais comumente usadas para o tratamento de várias infecções bacterianas (BRADFORD, 2001; KIM et al., 2002). Este grupo inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. O principal tipo de resistência a estes compostos pode ocorrer pela produção de enzimas que hidrolisam

irreversivelmente um componente essencial para atividade da droga, o anel beta-lactâmico, e são chamadas de beta-lactamases (OTTO; PRENDERGAST, 2014).

Essas enzimas periplasmáticas podem ser classificadas segundo a classificação molecular de Ambler, que as agrupa de A à D com base na similaridade entre estrutura e sequência de aminoácidos e a classificação funcional da enzima (AMBLER et al., 1991; DHILLON; CLARK, 2011) e a classificação funcional de Bush-Jacoby com base na sequência homóloga dos aminoácidos e utilização de substratos (BUSH; JACOBY, 2010). Estas enzimas normalmente são expressas por genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, integrons e transposons e assim podem ser transferidas de um micro-organismo a outro com rapidez e facilidade (SEIFFERT et al., 2013a).

A primeira beta-lactamase foi descrita em 1940 em uma *Escherichia coli*, descrita como uma cefalosporinase do tipo AmpC e com a capacidade de degradar a ampicilina, muitos anos antes do uso da penicilina na clínica (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Com o avanço no desenvolvimento de novos antimicrobianos e a introdução das cefalosporinas de 3º geração no tratamento de infecções no início dos anos 80, um novo tipo de enzima foi descrito: as chamadas de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) com seu primeiro relato datando de 1983 (PITOUT, 2013).

### 2.6.1 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), demonstram resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira, terceira, quarta geração e ao aztreonam, permanecendo sensíveis as cefamicinas, aos carbapenêmicos e aos inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (SEIFFERT et al., 2013b).

As infecções causadas por cepas resistentes produtoras de ESBL muitas vezes levam a maior morbidade e mortalidade nos hospitais, aumento dos custos com os pacientes e limitam ainda mais as opções terapêuticas disponíveis (SLAMA, 2008).

Essas enzimas podem estar integradas no cromossomo das bactérias ou podem ser mediadas por plasmídeos/transposons, sendo os genes bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>CTX-M</sub> os principais tipos de ESBLs descritas, inclusive em APEC e pertencem segundo a classificação de Ambler à classe A, além de outras variantes clinicamente importantes menos frequentes (OLSEN et al., 2014).

A primeira enzima beta-lactamase mediada por plasmídeo conhecida foi a TEM-1, no início dos anos sessenta, isolada na Grécia a partir de uma *E. coli* isolada de uma paciente chamada Temoniera (DATTA; KONTOMICHALOU 1965; BRADFORD, 2001). A primeira enzima do tipo TEM a mostrar o fenótipo do tipo ESBL foi a TEM-3, relatada inicialmente em 1989. Já as enzimas beta-lactamases do tipo SHV-1 foram primeiramente detectadas integradas

no cromossomo de *Klebsiella pneumoniae*, porém são encontradas em outras espécies de Enterobactérias, como em *E.coli*, e são mediadas por plasmídeos (AL-BAYSSARI et al., 2015). A maioria das ESBLs detectadas em infecções nosocomiais em todo o mundo durante os anos de 1980 e 1990 foram as do tipo TEM e SHV derivadas das enzimas de espectro primordiais TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (PITOUT, 2013).

Mais recentemente foram descritas as enzimas do tipo CTX-M, que se refere à potente atividade hidrolítica dessa enzima contra a cefotaxima (POIREL, 2012), e é uma família complexa e que atualmente abrange mais de 170 tipos de variantes (LAHEY CLINIC, 2017: <http://www.lahey.org/studies/>). Acredita-se através de análises filogenéticas que essas enzimas se originaram da aquisição de um plasmídeo com genes *bla<sub>CTX-M</sub>* pré-existentes integrados ao cromossomo do gênero *Kluyvera* spp, uma bactéria comensal e de origem ambiental. A primeira enzima CTX-M foi detectada em 1989 também em uma cepa de *E. coli*, na Alemanha (BAUERNFEIND et al, 1990). Estas, rapidamente foram se disseminando e atualmente são mundialmente o tipo de ESBLs mais frequentemente distribuído em *Enterobacteriaceae* (LAHLAOU; HAJ; MOUSSA, 2014). São comumente encontradas no ambiente hospitalar, mas também em altos índices entre bactérias multirresistentes isoladas da comunidade (HARRIS, 2015).

No Brasil, a primeira ocorrência de CTX-M data de 1990, onde foi descrita uma nova CTX-M: CTX-M-8, isolada de infecções clínicas causadas por *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus* (BONNET et al., 2000).

As enzimas do tipo CTX-M são mais ativas contra cefotaxima e ceftriaxona em relação a ceftazidima (AL-BAYSSARI et al., 2015), e podem ser classificadas de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos em sete grupos sendo os principais: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25, e recentemente adicionados os grupos CTX-M-74 e CTX-M-75. O grupo CTX-M-1 inclui as variantes CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e FEC-1. O grupo CTX-M-2 inclui CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -76, e -77. O grupo CTX-M-8 inclui CTX-M-8, -40 e -63. O grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -27, -45, -46, -47, -48, -49, -50. O grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39, -41 e -91. Já os novos grupos CTX-M-74 inclui a enzima CTX-M-74 e o CTX-M-75 a variante CTX-M-75 (CANTÓN; COQUE, 2006; BONNET, 2004; LAHLAOU; HAJ; MOUSSA, 2014).

Os plasmídeos de resistência que normalmente transportam os genes de ESBL, como os do grupo CTX-M, geralmente podem também carrear outros genes de resistência a antimicrobianos, como por exemplo, outras ESBLs (*bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*), aminoglicosídeos,

tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas, podendo ocasionar uma co-resistência, co-expressão e co-seleção (KIM et al., 2002).

Estudos mostram que essas famílias são endêmicas em muitos países da Europa, Ásia e América do Sul, com índices de prevalência das enzimas CTX-M em *E. coli* variando entre 30 a 90%. No mundo, há uma alta prevalência do tipo CTX-M-1 incluindo as variantes CTX-M-15 e CTX-M-14 que frequentemente são encontradas em humanos, animais e no ambiente (CANTÓN et al., 2008). Em nosso país, as variantes mais comuns encontrados são CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (VILLEGAS et al., 2008).

### 2.6.2 AmpC *beta*-lactamases

Existe outra classe de produção de *beta*-lactamases: as do tipo AmpC, que pertencem a classe C da classificação de Ambler e ao grupo 1 segundo a classificação de Bush (BUSH; JACOBY, 2010). Essa classe não é considerada uma ESBL autêntica, porém pode apresentar resultados fenotípicos e/ou genotípicos característicos. Elas degradam as penicilinas, cefamicinas e induzem a degradação de cefalosporinas de terceira geração como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, cefamicinas e o aztreonam e não são inibidas pelo ácido clavulânico (AL-BAYSSARI et al., 2015; OLSEN et al., 2014).

Nas classes de AmpC existem variados tipos de enzimas como: ACC, ACT, DHA, CMY, FOX, LAT, MIR e a MOX. Atualmente são conhecidos 136 alelos de CMY, que são frequentes em bactérias Gram-negativas, 12 variedades de FOX, cinco de ACC, uma de LAT, 18 de MIR, 38 variedades de ACT, 11 de MOX e 23 variedades de DHA (LAHEY CLINIC, 2015).

Em *E. coli* a atividade de *beta*-lactamases do tipo AmpC existe quando há hiperexpressão da enzima, e isto é controlado através de um mecanismo de atenuação e regulação dos promotores no cromossomo, já que essa bactéria não possui o gene *ampR*, necessário para a indução desse mecanismo (JACOBY, 2009). Outra possível rota para expressão das *beta*-lactamases do tipo AmpC é através dos plasmídeos (pAmpc). Essas AmpC *beta*-lactamases mediadas pelos plasmídeos são de alta frequência, pois podem ser transferidas por conjugação através das bactérias (OLSEN et al., 2014).

No Brasil, existem poucos relatos de produção de AmpC mediada por plasmídeos em humanos, sendo recente a identificação de uma CMY-2 em *Klebsiella pneumoniae* isolada de um paciente em um hospital brasileiro (CAMPANA et al., 2013; PAVEZ et al., 2010). Já no âmbito veterinário, acredita-se que os animais podem ser a fonte de infecção ou o reservatório de resistência, por isso *E. coli* produtoras de AmpC tem sido altamente isoladas de animais de produção).

Um fator importante na caracterização de bactérias produtoras de AmpC é a dificuldade na identificação fenotípica destas cepas, podendo ser causado pela presença de diversas beta-lactamases em um mesmo organismo ou a combinação de ESBLs- AmpCs e também devido a ausência de padronização de técnicas para detecção destes mecanismos entre os principais manuais como o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST), o que impede a determinação dos índices de prevalência e a investigação da epidemiologia destas enzimas impactando as medidas de prevenção e controle da disseminação (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

### 2.6.3 Beta-lactamases na avicultura

A disseminação global do uso desenfreado de antimicrobianos, tanto como promotores de crescimento ou com função terapêutica na cadeia de produção animal, contribui através da seleção natural, para o aumento emergente de patógenos resistentes a estes compostos (VAN BOECKEL et al., 2015). Isto se torna alarmante já que os animais são considerados possíveis reservatórios de genes de resistência aos antibióticos necessitando de uma atenção mais intensa devido ao seu impacto significativo na saúde humana (SEIFFERT et al., 2013a).

O primeiro relato de *E. coli* produtora de ESBL em animais ocorreu em 1998, com o isolamento de uma beta-lactamase do tipo SHV-12 de um cão com infecção urinária. Desde então vem se despertando um grande interesse sobre a pesquisa desses genes e aumento na detecção de ESBLs em animais (ABREU et al., 2014).

Em aves, o primeiro caso de detecção de beta-lactamases em *E. coli* ocorreu na Espanha entre os anos de 2000 e 2001 encontrando-se os genes CTX-M-14, SHV-12 e CMY-2 (EWERS et al., 2012). Atualmente, altos índices de prevalência de isolados produtores de ESBL/AmpC estão sendo relatados em frangos de corte e na carne destinada ao consumo (COHEN STUART et al., 2012; DIERIKX et al., 2013b).

Em um estudo realizado por nosso grupo em 2013, foram analisadas 121 amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango comercializados na região norte do Paraná, sendo que destas, 39 cepas foram positivas para produção de ESBL e o grupo CTX-M-2 foi o mais prevalente em 64,1% dos casos (KOGA et al., 2015a). Dados de Botelho et al. (2015) evidenciaram que de 136 *E. coli* isoladas de carcaças de frangos de diferentes produtores do Brasil, 34% delas eram produtoras de ESBL, sendo 65% do grupo CTX-M-2, 30% do grupo CTX-M-8 e 3.8% do tipo CTX-M-15. Outro estudo em São Paulo, detectou uma prevalência de 8% de *E. coli* produtora de ESBL em amostras da microbiota de frangos produzidos na região, pertencendo principalmente aos grupos CTX-M-8 e CTX-M-2 e somente um isolado ao grupo CTX-M-15 (FERREIRA et al., 2016)

A maior parte dos países desenvolvidos reconheceram a importância dos programas de vigilância da resistência bacteriana e buscam acompanhar as mudanças na susceptibilidade antimicrobiana de certos patógenos que ameaçam a saúde pública elaborando estratégias apropriadas para seu controle (NORM/NORM-VET, 2013; ECDC, 2014). A utilização prudente de antibióticos tanto na medicina veterinária quanto humana é um dos pré-requisitos para o sucesso de tratamentos de doenças infecciosas melhorando assim a qualidade de vida dos animais e da população (EWERS et al., 2012). Assim, a investigação de *E.coli* produtora de ESBL e AmpC em aves é essencial para um tratamento inteligente e eficiente nos animais, colaborando para o sucesso do sistema produtivo, e permitindo minimizar a transferência de genes (LI et al., 2015).

## 2.7 Risco zoonótico

Vários estudos baseados na determinação de sorogrupos, na presença dos genes virulência, na classificação filogenética e na tipificação de sequência multilocus (MLST) tem demonstrado que há poucas diferenças entre os perfis genéticos e de virulência entre os patótipos de ExPEC, como as *E.coli* uropatogênicas (UPEC), *E.coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E.coli* patogênicas para aves (APEC), que independem da origem e do hospedeiro, evidenciando o possível risco zoonótico destas cepas (EWERS et al., 2007; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). Análises de epidemiologia molecular demonstram que diversos reservatórios potenciais para ExPEC tem sido identificados, como o trato intestinal humano e outros não humanos como animais de companhia, alimentos de origem animal, e outras fontes ambientais (MANGES; JOHNSON, 2012).

Produtos derivados da carne frango exibem os maiores índices de contaminação por *E.coli* do que as outras carnes e são suspeitos de constituírem uma das fontes de origem alimentar mais relacionadas com ExPEC e com as cepas resistentes aos antimicrobianos em seres humanos (MORA et al., 2013).

Estudos de Manges e Johnson (2012) indicaram o possível papel dos frangos destinados ao consumo como uma possível fonte de ExPEC ao revelarem a presença de amostras de APEC geneticamente similares as cepas responsáveis por doenças em humanos, tanto no intestino de frangos saudáveis como na carne de frango obtida em mercados. Johnson e colaboradores (2005) relataram contaminação por *E. coli* em 92% das amostras isoladas de carne de frango, e destas 46% continham fatores de virulência associados a ExPEC e 15.6% foram identificadas como UPEC.

A afirmativa de que ExPEC tem o potencial risco zoonótico também é intensificada por estudos experimentais de Zhao et al. (2009) e de Tivendale et al. (2010), onde se evidencia a

habilidade de cepas de ExPEC humanas causarem colibacilose em modelos experimentais de frangos e na capacidade de ExPEC aviária em causar infecções humanas em modelos animais.

A transmissão de ExPEC de frangos para humanos pode ocorrer principalmente através do consumo da carne contaminada, mas também através da contaminação de utensílios utilizados na preparação destes produtos, através da água contaminada e do ambiente (BÉLANGER et al., 2011).

O crescimento do setor avícola associado ao uso desordenado e intenso de antimicrobianos na pirâmide de produção aumentou ainda mais a seleção e o aparecimento de resistência. As recentes linhagens de ExPEC capazes de causar doenças estão se tornando cada vez mais multirresistentes e como consequência mais difíceis de tratar, levando a um aumento nas taxas de mortalidade e na duração do tratamento de infecções tanto em animais como humanos (MANGES; JOHNSON, 2012; MØLBAK, 2004). Além disso, há o fato de esses genes de resistência serem encontrados em elementos genéticos móveis permitindo uma rápida disseminação entre a população bacteriana (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004).

Estudos mais recentes tem apontado alta similaridade genética entre as cepas de *E.coli* produtoras de ESBL em humanos com as de carne de frango sugerindo que os alimentos de origem animal sejam possíveis reservatórios de genes ESBL (ABREU et al., 2014; DIERIKX et al., 2013b). O potencial risco de transmissão das cepas de ExPEC é tão preocupante para a saúde pública, que colocou em estado de alerta o Centers For Disease and Prevention (CDC) levando-os a gerar relatórios informativos sobre o risco zoonótico dessas cepas e sua eventual transmissão através da carne de frango (MELLATA, 2013).

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ABPA. Associação Brasileira de proteína Animal. **Relatório Anual 2016**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>. Acesso em: Nov/2016.
2. ABPA. Associação Brasileira de proteína Animal. **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <http://abpabr.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>. Acesso em: Nov/2016.
3. ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**. v.146, p.837,1940.
4. ABREU, R. et al. Prevalence of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Escherichia coli* Strains. v. 11, n. 11, p. 868–873, 2014.
5. AMBLER, R.P. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**. v. 276 (Pt 1), p.269-270, 1991.
6. AL-BAYSSARI, C. et al. Detection of expanded-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 9, p. 1139–1158, 2015.
7. ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores do crescimento. In: PALERMO NETO, J., SPINOSA, H. S., GORNIAC, S. L. **Farmacologia aplicada a avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. v.1, Cap. 9, p. 149-159.
8. ALLIX, E. **Promotores de Crescimento para frangos de corte**. 2010. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
9. ALVARENGA, L. et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. April, p. 249–254, 2015.
10. ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. de M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775–790, 15 maio 2012.
11. ARLET, G.; PHILIPPON, A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). **FEMS microbiology letters**, v. 66, n. 1, p. 19–25, 15 jul. 1991.
12. ASAI, T. et al. Control of the Development and Prevalence of Antimicrobial Resistance in Bacteria of Food Animal Origin in Japan: A New Approach for Risk Management of Antimicrobial Veterinary Medicinal Products in Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 8, p. 1–6, 2014.
13. BAUMFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v.18, n. 5, p. 294-298, 1990.
14. BARBIERI, N. L. et al. Molecular Characterization and Clonal Relationships Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Colisepticemia. **Foodborne**

**Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 74–83, 2015.

15. BEDENIC, B. et al. Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 13, n. 1, p. 24–33, fev. 2001.
16. BÉLANGER, L. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2011.
17. 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, n. 2, p.654-9, Fev.1982
18. BRASIL. Portaria nº193 de 12 de maio de 1998. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Regulamento Técnico para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário.
19. BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa Nº 9, de 27 de junho de 2003. Proibi a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em Jan/2017.
20. BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa Nº 26, de 9 de julho de 2009. Visa estabelecer as normas complementares para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego dos produtos antimicrobianos de uso veterinário, produzidos no país ou importados. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/leg\\_prod\\_veterinarios\\_WEB.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/leg_prod_veterinarios_WEB.pdf). Acesso em: Jul/2015.
21. BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa Nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proibi, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=30/11/2016>. Acesso em Dez/2016
22. BONNET, C. et al. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 22, p. 6955–62, nov. 2009.
23. BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases : the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.
24. BONNET, R. et al. A Novel CTX-M BetaLactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.
25. BORTOLAIA, V. et al. High diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.

- 54, n. 4, p. 1623–1626, 2010.
26. BOTELHO, L. A. B. et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 2, p. 249-254, 2015.
  27. BRADFORD, P. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.
  28. BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 6, n.3, p.953 – 959, 2009.
  29. BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
  30. CAMPANA, E. H. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. **Brazilian journal of microbiology**. v. 44, n. 2, p. 477–80, 2013.
  31. CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M  $\beta$ -lactamases pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.
  32. CANTÓN, R. et al. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. supp 1, p. 144–153, 2008.
  33. CARVALHO DE MOURA, A.C.; IRINO, K.; VIDOTTO, M.C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian diseases**, v. 45, n. 1, p. 173–81, 2012.
  34. CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry science**, v. 86, n. 11, p. 2466–2471, 2007.
  35. 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. 46, n. 1, p. 1–14, jun. 2013.
  36. CNA - Canal do Produtor. Evolução da avicultura no Brasil. Ativos Avicultura, vol.1, n.1, 2015. Disponível em: [http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/Ativos-Avicultura-n1\\_0.pdf](http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/Ativos-Avicultura-n1_0.pdf).
  37. COLLINGWOOD, C. et al. Is the Concept of Avian Pathogenic *Escherichia coli* as a Single Pathotype Fundamentally Flawed? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 1, p. 5, 14 out. 2014.
  38. DA COSTA, P. M. et al. Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 4, p. 299–306, 2008.
  39. DA SILVA, K. C. et al. High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. **Diagnostic**

**Microbiology and Infectious Disease**, out. 2016.

40. DA SILVEIRA, W. D. et al. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 323–328, 2002.
41. DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, p. 239-241, 1965.
42. DHEILLY, A. et al. Antimicrobial resistance selection in avian pathogenic *E. coli* during treatment. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 655–658, 2013.
43. DHILLON, R. H-P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v.2012, p. 1-11, 2011.
44. DIARRA, M. S. et al. Impact of Feed Supplementation with Antimicrobial Agents on Growth Performance of Broiler Chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* Counts, and Antibiotic Resistance Phenotypes and Distribution of Antimicrobial Resistance Determinants in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6566–6576, 2007.
45. DIERIKX, C. et al. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 60–67, 2013a.
46. DIERIKX, C. M. et al. Presence of ESBL / AmpC -Producing *Escherichia coli* in the Broiler Production Pyramid : A Descriptive Study. **PLoS One** , v. 8, n. 11, 2013b.
47. DOZOIS, C. M. et al. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145–4154, 2000.
48. DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER. J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, p.299-316, 1999.
49. DUTIL, L. et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 48–54, 2010.
50. DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 37, n. 4, p. 355–66, ago. 2008.
51. ECDC – Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2014. **Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network 2014**. Disponível em <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Acesso em: Dez/2016.
52. EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 2004.
53. EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical**

**Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.

54. EWERS, C. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: A global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 646–655, 2012a.
55. FERREIRA, J. C. et al. IncI1/ST113 and IncI1/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 4, p. 304–306, 2014.
56. FERREIRA, J.C. et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 85, n. 4, p. 444–448, 2016.
57. FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 41-47, 2005.
58. GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 21, 2012.
59. GRAHAM, J. P. et al. Fate of antimicrobial-resistant *Enterococci* and *Staphylococci* and resistance determinants in stored poultry litter. **Environmental Research**, v. 109, n. 6, p. 682–689, 2009.
60. GUABIRABA, R.; SCHOULER, C. Avian colibacillosis: still many black holes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 15, p. fnv118, 2015.
61. GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 321–332, 2004.
62. GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 9, n. 2, p. 149–158, 2008.
63. HARRIS, P. N. Clinical management of infections caused by *Enterobacteriaceae* that express extended-spectrum beta-lactamase and AmpC enzymes. **Seminars Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 56–73, 2015.
64. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **SIDRA – Banco de dados pecuária**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1094&z=t&o=1 &i=P>. Acesso em: Nov/2015.
65. IBRAHIM, D. R. et al. Multidrug resistant, extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p. fiw013, 2016.
66. JACOBY, G. A. AmpC-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.

67. JACOBY, G. A.; SUTTON, L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 164–169, 1991.
68. JIANG, H. X. et al. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 99–103, 2011.
69. JOHNSON, J.R. et al. Antimicrobial- resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 7, p. 1040-1049, marc. 2005.
70. JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.
71. KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**.v. 2, p. 123-140, 2004.
72. KILANI, H. et al. Virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 5, p. 1–8, 2015.
73. KIM, Y. et al. Bloodstream Infections by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children: Epidemiology and Clinical Outcome. **Society**, v. 46, n. 5, p. 1481–1491, 2002.
74. KOBAYASHI, R.K.; GAZIRI, L.C.; VIDOTTO, M.C. Functional activities of the *Tsh* protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. **Journal of Veterinary Science**. v. 11, n. 4, p. 315-319, 2010.
75. KOBAYASHI, R. K. T. et al. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 5, p. 631–634, 2011.
76. 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**, v. 2015, p.8 , 2015a.
77. 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, n. 6, p. 479–85, 2015b.
78. KÖHLER, C.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology** v. 301, p. 642–647, 2011.
79. LAHEY CLINIC. Disponível em: <[www.lahey.org/Studies](http://www.lahey.org/Studies)>. Acesso em 02 dez 2016.
80. LAHLAOUI, H.; KHALIFA, B. H.; MOUSSA, M. B. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$  -lactamase (ESBL). **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 9, p. 400–404, 2014.
81. LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **Veterinary journal**, v. 205, n. 1, p. 21–7, 2015.

82. LAUBE, H. et al. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3–4, p. 519–27, 2014.
83. LE GALL, T. et al. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in b2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 11, p. 2373–2384, 2007.
84. LEV, M.; BRIGGS, C. A. E. The gut flora of the chick. I. The flora of newly hatched chicks. **Journal of Applied Bacteriology**, 19: 36–38, 1956.
85. LI, Y. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. **Poultry science**, v. 94, n. 4, p. 601–11, 2015.
86. LINZMEIER, L. G. Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.7, n.12, jan.2009. Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/976s3vLOvIY3TKW\\_2013-6-24-16-28-21.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/976s3vLOvIY3TKW_2013-6-24-16-28-21.pdf)
87. LIU, X. et al. High Prevalence of  $\beta$ -lactamase and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from Dogs in Shaanxi, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–9, 2016.
88. 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, n. 2, p.161-168, 2016.
89. LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance : Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases** v. 36, n. Suppl 1, p. 11–23, 2003.
90. LU, Y. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from chicken in China. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 1, p. 45–53, 2011.
91. MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 5, p. 712–9, 2012.
92. MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 48, n. 8, p. 569–581, 2001.
93. MCPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy avian. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 245–253, 2005.
94. MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n. 11, p. 916–32, 2013a.
95. MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2015. Aves. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: nov/2016.
96. MØLBAK, K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans – the public health consequences. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 51, p.

- 364–369, 2004.
97. MORA, A. et al. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 506–512, 2013.
  98. MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 465–470, 2005.
  99. MOULIN-SCHOULEUR, M. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3366–3376, 2007.
  100. NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.
  101. NANDANWAR, N. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 835–842, 2014.
  102. NGELEKA, M. et al. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: Clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased avian. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 3118–3126, 1996.
  103. NOLAN, L. K. et al. Resistance to serum complement, iss and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.2, p. 101-110, 2003
  104. NORM/NORM- VET- Norwegian Veterinary Institute. **Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway**. Disponível em: [http://www.unn.no/getfile.php/UNN%20INTER/Fagfolk/www.antibiotikaresistens.no/NORM\\_VET\\_2013/NORM%20NORM-VET%202013.pdf](http://www.unn.no/getfile.php/UNN%20INTER/Fagfolk/www.antibiotikaresistens.no/NORM_VET_2013/NORM%20NORM-VET%202013.pdf). Acesso em: Dez/2016.
  105. NORMANNO, G. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 219-222, 2007.
  106. OBENG, A. S. et al. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 3–4, p. 305–315, 2012.
  107. OH, J. Y. et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from laying hens with colibacillosis on 2 commercial egg-producing farms in Korea. **Poultry science**, v. 90, n. 9, p. 1948–1954, 2011.
  108. OLSEN, R. H. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 9457, n. May 2014, p. 1–10, 2014.
  109. OTTO, C. M.; PRENDERGAST, B. Beyond Susceptible and Resistant, Part II: Treatment of Infections Due to Gram-Negative Organisms Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. **The journal of pediatric pharmacology and therapeutics**, v.

- 19, n. 3, p. 156–164, 2014.
110. PALERMO, J.N. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA H. S.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 52, p. 641-658.
111. PASQUALI, F. et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. **Veterinary microbiology**, v. 178, n. 3–4, p. 230–7, 5 ago. 2015.
112. PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. Pt 8, p. 948–954, 2010.
113. 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, n. 6. p. 2272-84, Jun. 2009.
114. PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–62, jun. 2002.
115. PERSOONS, D. et al. Antimicrobial use in Belgian broiler production. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 105, n. 4, p. 320–325, 2012.
116. PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert review of anti-infective therapy** p. 1165–1176, 2012a.
117. PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 9, 2012b.
118. PITOUT, J. D. D. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in the community: the tip of the iceberg? **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 2, p. 257–63, 2013.
119. POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1031-1034, 2002.
120. PRICE, L. B. et al. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* isolates from Conventional and Antibiotic-Free Chicken Products. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 5, p. 557–560, 2005.
121. PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Role of Crl in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. **Infection and Immunity**. v. 60, n. 11, p. 4460–67, 1992.
122. RANDALL, L. P. et al. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 86–

- 95, 2011.
123. REIS, M. P. **Uso da bacitracina de zinco e do sulfato de colistina como melhoradores de desempenho em frangos de corte.** 2011. 67p. Dissertação (Mestrado- Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
124. RICCOBONO, E. et al. Carriage of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Among Healthy Children and Home-Raised Chickens. **Microbial Drug Resistance** v. 18, n. 1, p. 10–13, 2012.
125. SADEYEN, J.-R. et al. Immune responses associated with homologous protection conferred by commercial vaccines for control of avian pathogenic *Escherichia coli* in turkeys. **Veterinary research**, v. 46, p. 5, 2015.
126. SCHOULER, C. et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1673–1678, 2012.
127. SEIFFERT, S. N. et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? **Drug Resistance Updates**, v. 16, n. 1–2, p. 22–45, 2013b.
128. SHEIKH, A. A. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 7, p. 625–31, 2012.
129. SIMONEIT, C. et al. Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken – A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 1, p. 1–7, 2015a.
130. **SINDIAVIPAR** – Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Disponível em: [HTTP://sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=159559](http://sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=159559). Acesso em: Nov/2016.
131. SLAMA, T. G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical care**, v. 12.Suppl 4, p. S4, 2008.
132. SMET, A. et al. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34 .p. 295–316. 2010.
133. SMITH, J. L. et al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1404–1414, 2007.
134. SOLÀ-GINÉS, M. et al. Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–14, 2015.
135. TIVENDALE, K. A. et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3412–3419, 2010.

136. UBABEF- União Brasileira de Avicultura e Exportadores de Frango. **A saga da Avicultura Brasileira**. Rio de Janeiro: Insight ; São Paulo : UBABEF , 2011. 120p. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/files/publicacoes/fcc1856de5f036bb47a8a246a0781e26.pdf>>. Acesso em: Nov/2015
137. UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>  
Acesso em: Nov/2015
138. UNNO, T. et al. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5659–5666, 2009.
139. VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–54, 19 mar. 2015.
140. VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327–335, 2000.
141. VANNI, M. et al. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. **Poultry science**, v. 93, n. 4, p. 856–63, abr. 2014.
142. VERSALOVIC, J. et al. Use of the Polymerase Chain Reaction for Physical Mapping of *Escherichia-Coli* genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 17, p. 5253–5255, 1991.
143. VIDOTTO, M.C., et al. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, n.3, p. 531-538, Jul/Set. 1991.
144. VILLEGAS, M. V et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. **Clinical microbiology and infection**, v. 14 Suppl 1, p. 154–158, 2008.
145. ZANATTA, G. F. et al. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária à antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 283–286, 2004.
146. WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.
147. WRAY, C.; DAVIES, R.H.; CORKISH, J.D. Enterobacteriaceae. In: Jordan TW, Pattison M, editors. **Poultry Diseases**, v. 4, p. 9–43, 1996.
148. ZHAO, L. et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E.coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v.155, v.5, p. 1634-1644, 2009.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Caracterizar genotipicamente as amostras de *E.coli* isoladas de frangos doentes (APEC) quanto a presença de fatores de virulência e genes resistência e compará-los com isolados de *E.coli* provindos do ambiente e da microbiota intestinal de frangos saudáveis

### 4.2 Objetivos específicos

- Pesquisar os fatores de virulência (característicos de APEC) em *E.coli* isoladas dos frangos com colibacilose, *E.coli* isoladas da microbiota de aves saudáveis e *E. coli* presentes no ambiente da produção.
- Pesquisar a classificação filogenética dos isolados.
- Estabelecer os perfis de resistências aos antimicrobianos dessas cepas.
- Pesquisar e estudar os genes de resistência relacionados aos beta-lactâmicos presentes nas amostras.
- Investigar a presença da resistência plasmidial a colistina: gene *mcr-1*
- Investigar a relação clonal das amostras através do ERIC-PCR.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

### 5.1 Artigo Científico

A ser enviado para a revista “Frontiers in Microbiology” session Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.

#### **High prevalence of multiresistant avian pathogenic *Escherichia coli* harbouring extended spectrum beta-lactamases genes causing an outbreak of colibacillosis in Brazil**

Maysa Chueiri Miranda<sup>1</sup>, Vanessa Lumi Koga<sup>1</sup>, Leonardo Pinto Medeiros<sup>1</sup>, Larissa Ciappina de Camargo<sup>1</sup>, Erick Nishio<sup>1</sup>, Juan Josue Puño Sarmiento<sup>1</sup>, Eliana Carolina Vespero<sup>2</sup>, Alexandre Oba<sup>3</sup>, Gerson Nakazato<sup>1</sup>, Ana Angelita Sampaio Baptista<sup>4</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

<sup>3</sup> Department of Zootechnny, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Center of Agricultural Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

#### **\* Correspondence:**

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia – CCB. Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Caixa Postal 6001,86051-980, Londrina, Paraná, Brazil.  
TeL: 55 (43) 33714396, Fax number: 55 (43) 33714788.  
Renata K. T. Kobayashi  
**kobayashirkt@uel.br**

## 45 ABSTRACT

46 Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are agent of avian colibacillosis, which promote  
47 significant economy losses for the poultry industry. Seeking control of the spread of pathogens  
48 and elimination of infections, the use of additives and the therapeutic treatment with  
49 antimicrobials has been one of the first steps to control the morbidity and mortality in broiler  
50 chickens caused by this infection. However, has been noticing the increase in the number of cases  
51 of multiresistant *Escherichia coli* in chicken meat. In this study, a total of 60 isolates of  
52 *Escherichia coli* were isolated from a broiler farm in Southern of Brazil from different sources,  
53 being 14 isolated from lesions of avian colibacillosis, 14 from microbiota of healthy chickens, 22  
54 from the poultry litter and 9 from the poultry sheds. The antimicrobial susceptibility testing  
55 showed a high-frequency resistance to almost all tested antimicrobials, except for ciprofloxacin  
56 and enrofloxacin. The resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim and ampicillin were the most  
57 frequently observed with 71.6% of the strains, followed by cefotaxime (58.3%) and tetracycline  
58 (46.6%). A total of 40 (66.6%) isolates showed resistance to three or more classes of  
59 antimicrobials tested, featuring a multiresistant profile. The presences of ESBL-producing *E. coli*  
60 were detect in 47 isolates (78.3%), and the most frequent group found was CTX-M-1. The  
61 presence of *mcr-1* gene was find in one (1.6%) isolate of the poultry litter. The phylogenetic  
62 classification showed that the predominant groups were group D and group A, although, the  
63 groups B1 and B2 have also been found, and *iutA* was the most prevalent virulence gene found,  
64 followed by *ompT* and *iss*. The analysis from ERIC-PCR showed a clonal diversity in the strains  
65 disseminated in the poultry farm. These strains of *E. coli* could be a reservoir of these genes,  
66 indicating a problem for public health due to the impact of zoonotic risk. A monitoring of strains  
67 harboring virulence factors and the rational use of antimicrobials could be strategies to minimize  
68 the disease and the dissemination of resistance.

69 **Keywords:** poultry, *Escherichia coli*, multiresistance, beta-lactamases, colibacillosis.

## 70 71 INTRODUCTION

72 *Escherichia coli* are a colonizing of the gut of animals and humans, and also the pharynx  
73 and trachea of avian, being consider normally safe, although some strains can be pathogenic and  
74 cause diseases (Guabiraba and Schouler, 2015). Due to that characteristic it is considered a  
75 sentinel microorganism for indicator of food contamination and the detection of resistance (Abreu  
76 et al., 2014).

77 A group of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) called Avian pathogenic  
78 *E. coli* (APEC) cause an important systemic disease called avian colibacillosis which can lead  
79 avian to death (Oh et al., 2011). This syndrome is starts with a respiratory infection and can  
80 evolve to septicemia with the commitment of various intern organs, causing perihepatitis,  
81 peritonitis, pericarditis, airsacculitis and others (Li et al., 2015) leading to mortality and morbidity  
82 of the chicken. Some virulence genes such as toxins (*hlyF*), proteases (*ompT*), iron acquisition  
83 systems (*iutA*, *iroN*), autotransporters (*tsh*), and resistance to serum (*iss*) are related to these  
84 strains, associated with the clinic symptoms causing the pathogenesis of APEC (Solà-Ginés et al.,  
85 2015). Some studies related that this *E. coli* isolated from poultry had a potential zoonotic risk  
86 due to the similarity of virulence genotype with human extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC)  
87 strains (Bélanger et al., 2011)

88 To avoid and control the appearance of diseases, the poultry industry depends on the use  
89 of antimicrobials, acting as therapeutic compounds and also as growth promoters to increase feed  
90 efficacy (Van Den Bogaard and Stobberingh, 2000; Mellata, 2013). However, the UE is a  
91 exception, because there the use of antibiotics as growth promoters were prohibit since 2006  
92 (Persoons et al., 2012). The continuous exposure to the selection pressure due antimicrobials  
93 treatments with different classes has been contributing to the spread of antimicrobial resistance

94 (AMR) in animals and also humans (Simoneit et al., 2015a). The emergence of extended-  
95 spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases producing *E.coli* are a particular concern,  
96 because they can confer resistance to third-generation of cephalosporins, penicillin and  
97 monobactams, drugs of choice to treat infections caused by Enterobacteriaceae in humans  
98 (Ibrahim et al., 2016; Laube et al., 2014). Among the types of ESBL, the genes belonging to  
99 CTX-M group are more prevalent both in medical clinic and in production animal (Kilani et al.,  
100 2015; Ewers et al., 2012b; Dierikx et al., 2013). Another important point is the recent appearance  
101 of strains resistant to colistin, an antimicrobial that belongs to the class of polymycins. Actually it  
102 is one of the last options in treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in hospitals  
103 (Kusumoto et al., 2016), and its use is allow in animal production in some countries (Liu et al.,  
104 2016). Recently, a plasmid encoded resistance to colistin, *mcr-1*, was identified in strains of *E.coli*  
105 from different sources, especially from animals (Kusumoto et al., 2016), putting the whole world  
106 on alert about the possible zoonotic spread of these gene, the risk to human health and the  
107 importance of surveillance programs.

108 Several studies has demonstrated that poultry can be a source or possible reservoirs of  
109 virulence and resistance genes (Ewers et al., 2004; Ewers et al., 2007; Kobayashi et al., 2011).  
110 These bacteria are capable of transfer these genes by plasmid-transfer through the food chain to  
111 other pathogens/species causing disease and committing the therapeutic success in animals and  
112 humans (Abreu et al., 2014; Collingwood et al., 2014; Koga, et al., 2015a; Ibrahim et al., 2016;  
113 Solà-Ginés et al., 2015). The phylogenetic classification of ExPEC in general helps to  
114 differentiate the pathogenic strains that are more often related with B2 and D phylogroups, from  
115 those that are commensal *E.coli* that usually belongs to A and B1 phylogroups (Johnson et al.  
116 2008; Clermont et al. 2013).

117 The monitoring of ESBL-producing *E.coli* and *mcr-1* gene from animals and the  
118 investigation of the resistance and virulence genes more associated with them are extremely  
119 important to evaluate the distribution of these strains in the environment, establish better  
120 protocols for disease prevention and to guide the rational use of antimicrobials in food animals  
121 production (Li et al., 2010), since few studies have been reporting colibacillosis outbreaks in  
122 broiler chickens, and maybe has not been intensively investigate. For this reason, the objective of  
123 this study were detect the prevalence of multiresistance to antimicrobials, the virulence factors  
124 and the beta-lactamases resistance genes presents in *E.coli* causing a outbreak of avian  
125 colibacillosis in Brazil and compare them to *E.coli* from others sources of broiler production.

126

127

## MATERIALS AND METHODS

### 128 2.1- Bacterial strains and isolation

129 All strains of *E. coli* were isolated from different origins of a broiler farm localized on southern of  
130 Brazil, between October to December 2015. Overall, 60 strains of *E. coli* were obtained, being 14  
131 isolates from lesions of avian colibacillosis (APEC), 22 from poultry litter, 15 from microbiota of  
132 healthy broilers, and 9 from poultry house. The strains were isolated and cultured in different  
133 culture media. The confirmation of all suspected colonies was realized via biochemical tests such  
134 Enterokit B (Probac, São Paulo, Brazil) and Simon's citrate Agar (Merck, KGaA, Darmstadt,  
135 Germany).

136

#### 137 2.1.2- Lot historic and sampling of sick broilers

138 The Cobb-Vantress broiler chicks were house in a conventional shed for 45 days receiving water  
139 and food *ad libidum* and heating as required. After 10-15 days, it was noticed a high mortality and  
140 low weight. In the necropsy exam was observe, perihepatitis, fibrinous-purulent pericarditis,  
141 airsacculitis and peritonitis. All these symptoms compatible with colibacillosis. The organs (liver,  
142 heart, spleen, and caseous exudate from lung) of seven animals were fragmented, collected and  
143 incubated in BHI broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) and after plated Blood Agar  
144 Base with 5% of defibrinated sheep blood and MacConkey Agar (Oxoid, Hampshire, UK)

145 supplemented with Cefotaxime (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 4µg/ml (CLSI, 2015).  
146 Was observe the growth of colonies on each plate and were select 1 to 3 colonies on MacConkey  
147 for performing biochemical screening.

148

### 149 **2.1.3 - Sampling of microbiota of healthy broilers**

150 At 35 days of life 15 animals that showed no clinical manifestations of the disease was randomly  
151 chosen to be sacrificed and intestine fragments were and incubate in BHI broth (Oxoid Ltd.,  
152 Basingstoke, Hampshire, UK), and realized the tests under the same conditions that previous and  
153 performed biochemistry screening.

154

### 155 **2.1.4- Sampling at poultry litter**

156 The poultry litter has been used previously for other lots and was reused by the owner. It was  
157 collect about 500g of the litter. The material was weighed and serial dilutions (1:10) were carried  
158 out in PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7, 2. Each dilution was plated into MacConkey Agar  
159 (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with Cefotaxime (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)  
160 4µg/ml (CLSI, 2015). From each plate, a single colony of typical morphology was pick and  
161 submits to biochemistry screening.

162

### 163 **2.1.5- Sampling at poultry house**

164 After the withdrawal of the lot, it was performed the cleaning and disinfection  
165 (Quaternary ammonium) of the place, and it was reap swab drag from nine areas from the poultry  
166 house (sheds). The material was also incubating in BHI growth (Oxoid Ltd., Basingstoke and  
167 Hampshire, UK) and after it was plate in MacConkey agar (Oxoid, Hampshire, UK)  
168 supplemented with Cefotaxime (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 4µg/ml (CLSI, 2015).  
169 Was verified the growth of the colonies in each plate and then we identified the strains for  
170 biochemistry screening.

171

## 172 **2.2 – Phylogenetic typing**

173 The strains of *E. coli* were submitt to PCR (Polimerase Reaction Chain) to verify the phylogenetic  
174 typing according to the method of Clermont and colleagues (2013). This methodology classifies  
175 the strains in 7 groups (A, B1, B2, C, D, E, F) and clado I. It is bases on the analysis of the  
176 presence of the *chuA*, *yjaA*, *arpA* genes and a DNA fragment (TSPE4.C2). The primers and the  
177 amplicon size are given in **Table 1**.

178

## 179 **2.3- Detection of virulence genes**

180 For this study, the presence of six genes encoding virulence factors most prevalent in APEC was  
181 analyze by PCR in all strains of *E. coli* isolates. They were *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT* (Johnson  
182 et al., 2008) and *tsh* (Dozois et al., 2000) and are shown in more details in **Table 1**.

183

## 184 **2.4- Antimicrobial susceptibility testing and phenotypic detection of ESBL/AmpC**

185 The disc diffusion antibiotic sensitivity tests were carried out in Muller-Hinton Agar (Sigma-  
186 Aldrich, Saint Louis, MO, USA) plate according to the orientations of Clinical and Laboratory  
187 Standards Institute guidelines (CLSI, 2015), and for enrofloxacin was utilize Clinical and  
188 Laboratory Standards Institute guidelines for animals (CLSI, 2008). *E. coli* ATCC 25922 was use  
189 as a quality control. The antibiotics tested were: Ampicillin (10µg), amoxicillin - clavulanic acid  
190 (20µg/ 10µg), cefotaxime (30µg), ceftazidime (30µg), cefoxitin (30µg), tetracycline (30µg),  
191 gentamicin (10µg), nalidixic acid (30µg), ciprofloxacin (5µg), enrofloxacin (5µg) and  
192 trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 µg /23.75µg) all from Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire,  
193 UK. Strains resistant to third-generation cephalosporins were teste for detection of ESBL and  
194 AmpC. This was confirmed by double-disk diffusion (EUCAST, 2013) using discs of  
195 amoxicillin/clavulanate and cefotaxime/ceftazidime/cefepime/cefoxitine or using a combination  
196 disk test (Jacoby; Han, 1996; Vespero; Perugini; Saridakis, 2007) for ESBL, with cefotaxime,

197 cefotaxime + clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD), ceftazidime and ceftazidime +  
198 clavulanic acid (Becton Dickinson, Sparks, MD).

## 200 **2.5 – Genotypic Characterization of ESBL/AmpC and Genotypic Detection of Colistin** 201 **Resistance (*mcr-1* gene)**

202 The presence of ESBL genes encoding TEM and SHV and CTX- M (1, 2, 8, 9 and 25 groups)  
203 type was detected by PCR (Bedenic et al., 2001; Arlet and Philippon 1991; Woodford et al.,  
204 2004). All isolates were also tested for the production of AmpC enzymes with a multiplex PCR  
205 described by Pérez-Pérez and Hanson (2002) and the genotypic resistance to colistin was detected  
206 as described by Liu et al (2016). The details of the primers and conditions for the study of these  
207 genes are describe in **Table 1**.

## 209 **2.6 – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences (ERIC-PCR)**

210 To investigate the clonality of the strains was used ERIC-PCR method following the previous  
211 methodology with some modifications (Versalovic et al., 1991). DNA was extract by a PureLink™  
212 Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The PCR product was loaded onto a 2% w/v  
213 agarose gel and electrophoresed at 80V for 3h00min. The picture was capture using Image  
214 Capture Systems (LPixImageHE). The image was analyzed using BioNumerics software version  
215 7.6 (Applied Maths). All strains were submitt to ERIC-PCR reaction, but seventeen representative  
216 isolates were choose, using the parameters of visual inspection in the pattern of bands and the  
217 similarity in the genotypic and phenotypic characteristics to avoid repetition. This way, we  
218 obtained dendrogram using the Dice coefficient, and clustered by the un-weighted pair group  
219 method with arithmetic averages (UPGMA) with 1.5% of optimization and 1.5% of tolerance.

## 221 **2.7 – Statistical analysis**

222 Results were analyzed using Fischer test. Analyses were performed using R Statistical Software,  
223 version 3.1.0 (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Values of  $p < 0.05$  were  
224 considered significant.

## 226 **RESULTS**

### 227 **3.1- Distribution of virulence genes and phylogenetic characterization**

228 All the isolates were classified only into 4 groups: A, B1, B2 and D. In relation to the total of  
229 strains, most of them belonged to the group D (38.3%) that was more related with pathogenic  
230 strains, and to the group A (36.6%) more related with commensal *E. coli*, like shown in the **Table**  
231 **2**. Only four isolates were classified into group B2 and these isolates belonged to the sick broilers  
232 (APEC group) while the others strains present in APEC belonged in your majority to the group A  
233 (64.2%). In the microbiota group, 60% of the isolates belonged to group B1 and 33.3% to group  
234 D. Different situation was observed in the poultry house and poultry litter, where the majority of  
235 the isolates belongs to group A (55.5% / 31.8%) and D (44.4% / 59%).

236 In terms of virulence genes, the gene *iutA* had the major prevalence and was present in 43  
237 (71.6%) isolates, followed by *ompT* and *iss*, both in 29 (48.3%) isolates (n=60). However analysis  
238 of virulence profile (**Figure 1**), demonstrate the presence of all virulence genes distributed among  
239 the different groups. Only in the strains of poultry house was observed the absence of two of these  
240 genes (*iutA* and *tsh*) but positivity for the others. The strains of APEC had the presence of all the  
241 six genes in high levels in almost all the strains with 100% of positivity for *ompT* and *iutA*,  
242 92.8% for *hlyF*, *iss* and *iroN*, and also for *tsh* gene, that was present in five (35.7%) strains of  
243 APEC, when compared with the other groups. With regards to strains of *E. coli* from microbiota,  
244 the scene was a little different, where 80% were positive for *iutA* and 53.3% for *hlyF*, *ompT*, *iss*  
245 and *iroN*. The isolates of poultry litter had a lower positivity rate for these genes, although all  
246 them were detected, being the *iutA* gene the most prevalent in 17 (77.2%) of 22 isolates.

247

### 248 **3.2- Resistance profile to antimicrobials**

249 We found a high frequency of resistance to almost all antimicrobials tested in the different  
 250 groups, with the exception of ciprofloxacin and enrofloxacin, as shown in **Figure 2**. The  
 251 resistance to ampicillin was the most prevalent in all the strains with 100% of resistance, except in  
 252 the poultry litters (73%). The phenotypic resistance to cefotaxime, tetracycline and trimethoprim-  
 253 sulfamethoxazole had important ranges between the groups. Cefotaxime resistance was identified  
 254 in 11 (50%) isolates of poultry litters, 11 (78.5%) of sick broilers, 14 (93.3%) from microbiota  
 255 and 9 (100%) in poultry house. While the resistance to tetracycline and trimethoprim-  
 256 sulfamethoxazole was detected in 9/19 (41% / 86.3%) strains in poultry litters, 10/1 (71%/7%) in  
 257 sick broilers, 2/ 14 (13.3%/ 93.3%) in microbiota and 7/9 (78% and 100%) in poultry house. In  
 258 total, all strains were susceptible to ciprofloxacin, and except for one, there were also for  
 259 enrofloxacin. Additionally, less resistance to nalidixic acid (40%), gentamicin (30%) and  
 260 amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin and ceftazidime (12%) was notice. Among the total of  
 261 strains, all them had resistant to at least one antimicrobial tested. Furthermore we observed that 39  
 262 (65%) of them were multiple resistance to 3 or more class of antimicrobials, especially in strains  
 263 of poultry litter (86.3%), poultry house (77.7%) and microbiota (73.3%) (**Table 3**).

### 265 **3.3- Phenotypic and genotypic detection of ESBL and AmpC and genotypic detection of mcr-1** 266 **gene**

267 ESBL /AmpC producing *E.coli* were detect in 47 (78%) strains by the phenotypic screening tests  
 268 and are present in all the different groups tested. Positivity for the detection of these phenotype  
 269 were higher for APEC and poultry house appearing in 100% of the isolates, whereas for  
 270 microbiota and poultry litter was observed in 13 (86.6%) and 11 (50%) strains as shown in **Table**  
 271 **3**. Group 1 CTX-M was the most frequent gene associated with the ESBL phenotype found in  
 272 71.6% of cases of equally distributed and strains from sick broilers, microbiota and poultry litter  
 273 showed the CIT group of AmpC genes (16.5%). No gene SHV were detected, but group 2 CTX-  
 274 M was found in three strains from microbiota (20%) and one case from sick broilers (7.14%).  
 275 Seven isolates (46.6%) from microbiota contained gene TEM, as illustrated in **Table 4**. The  
 276 plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 was investigate in all isolates, but just one  
 277 (1.6%), from poultry litter, was positive for this gene as also shown in **Table 4**.

### 279 **3.4- Analysis from ERIC- PCR**

280 ERIC-PCR was perform to verify the clonal relationship between the isolates of the different  
 281 sources. The PCR with the primer pair ERIC of the seventeen representative isolates yielded  
 282 between seven to twenty-four bands, with sizes ranging from 100 to 10.000pb. According studies  
 283 by Fendri et al (2013) was utilized cut-off point at 80%. This permitted to classify our strains into  
 284 four clonal groups (E1-E4) at 80% of similarity threshold, and in addition, there were other small  
 285 clones, but these strains show to be not genetically relate to the other groups, like shown in  
 286 **Figure 3**.

## 287 **DISCUSSION**

289 *Escherichia coli* from poultry have being describe as the food animal source more closely related  
 290 to human ExPEC, with high zoonotic risk. The intensive use of antibiotics in animal husbandry  
 291 and veterinary medicine has taken to the selection of resistant pathogens and has been considered  
 292 a global health issue (Pitout, 2012b; Riccobono et al., 2012), due to the possibility of transmission  
 293 of genes along the food chain. The present study showed the presence of different clones of  
 294 ESBL-producing *E. coli* and high frequencies of multiresistant *E. coli* along a poultry production  
 295 chain in Brazil, harboring virulence factors and resistance genes, causing an avian colibacillosis  
 296 outbreak, and persisting during a long time in the environment, even after cleaning and  
 297 disinfection of it.

298 Our results showed that multiresistant *E. coli* was present in a big part of the strains (65%),  
299 especially in the poultry litter and microbiota. Studies around the world showed the occurrence of  
300 multidrug resistance (MDR) in *E. coli* from poultry varied 10.6 to 100% (Gyles, 2008; Obeng et  
301 al., 2012; Ferreira et al., 2014; Zanatta et al., 2004). Chinese data determined the prevalence of  
302 antimicrobial resistance in *E. coli* from poultry was of 81% (Jiang et al., 2011). Some reasons that  
303 can explain this variable difference between all the authors can be the difference geographical  
304 origin of the strains, the differences in the production management and associated antimicrobial  
305 selective pressure (Liu et al., 2016). Besides that, the fact that the sources, poultry litter and  
306 microbiota, had major frequency in our farm it is not surprising, considering that *E. coli* can act as  
307 reservoirs of resistance genes and that can persist in the environment during the production. The  
308 prevalence of multi resistant drug (MDR) it is not an exclusively characteristic of *E. coli* from  
309 poultry. Studies in China revealed a rate of 80% of MDR in strains of *Salmonella* sp. from  
310 chickens (Lu et al., 2011) and results from dairy farms in UK demonstrate that 57.9% of the  
311 strains were MDR (Ibrahim et al., 2016).

312 During many time, tetracycline and sulphonamides were extensively used as a growth  
313 promoter in feed, although since 2009 the use of then in the Brazil poultry industry has been  
314 banned (BRASIL, 2009). But they are still the drug of choice to treat infections caused by  
315 Enterobacteriaceae in animals, as beta-lactams and fluoroquinolones (Mellata, 2013). Despite of  
316 that, our strains display high levels of resistance to tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole,  
317 nalidixic acid and antimicrobials that act in the cell wall: ampicillin and cefotaxime. Lower rates  
318 were observe for ciprofloxacin and enrofloxacin. Some authors demonstrated that resistance  
319 genes against aminoglycosides, tetracycline, sulphonamides and cephalosporins are usually  
320 situated on the same plasmid which can explain the presence of these resistance profiles in many  
321 cases (Jacoby and Sutton, 1991; Freitag et al., 2016). In Switzerland, was reported 82.3% of  
322 resistance rate to tetracycline, 59.7% to trimethoprim-sulfamethoxazole and 38.7% to nalidixic  
323 acid in ESBL *E. coli* strains from poultry (Geser, Stephan, and Hächler, 2012). In recent studies in  
324 Brazil similar resistance rates to ours were describe in chicken carcasses (Koga et al., 2015a), and  
325 also from broiler chickens with colisepticemia and with high frequency to tetracycline, nalidixic  
326 acid and trimethoprim-sulfamethoxazole (Barbieri et al., 2015). Quinolones and fluoroquinolones  
327 has been much prescribed in cases of infection like an alternative to the increasing level of  
328 resistance to others classes of choice, and besides that, enrofloxacin is a released growth promoter  
329 in many places of the word (Vanni et al., 2014; Abreu et al., 2014). Our rates of resistance to  
330 quinolones, like nalidixic acid were high, but the low frequency of resistance to ciprofloxacin and  
331 enrofloxacin are not in agreement with other authors, who found a high prevalence of this  
332 resistance (Pasquali et al., 2015; Vanni et al., 2014; Li et al., 2015). The non use of quinolones  
333 during the production, as informed by the producer, can be collaborated with these results,  
334 suggesting that for now, these compounds could be an option for the treatment of infections in our  
335 strains, but its use even as growth promoter should be avoided and even banned.

336 With regard to *beta*-lactams antimicrobials, they are commonly implemented for treatment  
337 of clinical conditions in animals and humans (Seiffert et al., 2013). We observed a higher level of  
338 resistance to this class in comparison to other similar work in Spain, who found 78% of resistance  
339 to ampicillin, and 34% to cefotaxime in APEC strains (Solà-Ginés et al., 2015). Beta-lactamases  
340 enzymes are the main mechanisms of resistance to beta-lactams. Extended-spectrum beta-  
341 lactamases (ESBL) like TEM, SHV, CTX-M and AmpC beta-lactamases producing *E. coli* have  
342 being increasing globally (Ewers et al., 2012). Our high frequencies alert to the emergence of  
343 ESBL producing APEC. The number of ESBL-producing strains we found (78%) its similar with  
344 another research conducted in China, who showed 75.9% of positivity for these genes (Li et al.,  
345 2015). But was higher than similar others studies who reported ESBL-producing *E. coli* isolated  
346 from avian (Ferreira et al., 2014; C. M. Dierikx et al., 2013; Solà-Ginés et al., 2015; da Silva et  
347 al., 2016). The great spread of ESBL genes in poultry could be due to the use of third-generation  
348 cephalosporins, as ceftiofur, and also to the ability of this genes being transfer from different  
349 strains and from one ecosystem to another via mobile genetic elements (Dutil et al., 2010);

350 Mellata, 2013). Around all the world, CTX-M group has been arise as the predominant type of  
351 ESBL producing *E. coli* in humans and animals (Kilani et al., 2015). Our findings showed a  
352 prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, and the majority of the isolates belong to CTX-M-1 group, although  
353 CTX-M-2 group, TEM and CIT have been also detect. In Brazil, previous studies indentify a  
354 higher incidence of CTX-M-2 and CTX-M-8 groups (Ferreira et al., 2014; Koga et al., 2015b),  
355 but other countries have already reported the majority of CTX-M-1 group in their isolates (Smet  
356 et al., 2010; Geser, Stephan, and Hächler, 2012; Randall et al., 2011). The high levels found in *E.*  
357 *coli* harboring *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in poultry and other animal food-producing can be contributing to  
358 the transmission of these genes to humans (Kilani et al., 2015). Our results about colistin showed  
359 the presence of *mcr-1* gene in one isolate (1.6%) from poultry litter, and this is the first report of  
360 this gene in this type of source. Other studies have been find *mcr-1* in isolates from chicken and  
361 chicken meat, swine and human beings (Liu et al., 2016; Fernandes et al., 2016).

362 Infections caused by ExPEC depends on the presence and expression of a diversity of  
363 virulence factors and some of these genes as adhesins, invasins, toxins, iron acquisition and  
364 serum survive are more specific to characterized a certain groups of ExPEC called avian  
365 pathogenic *Escherichia coli* (APEC) (Mellata., 2013; Obeng et al., 2012). APEC causes avian  
366 colibacillosis resulting in huge losses to the producers (Schouler et al., 2012). Several studies with  
367 experimental animal models has been showing that APEC may represent a zoonotic risk due to  
368 the genetically similarity with ExPEC associated with human disease (Moulin-Schouleur et al.,  
369 2007; Tivendale et al., 2010; Mora et al., 2013). An important study described 5 essential genes  
370 (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, and *ompT*) carried on plasmids (Johnson et al., 2008), and in these we can  
371 include the *tsh* gene (Dozois et al., 2000), that are good markers for characterized APEC strains.  
372 In the current study, the genes *ompT*, *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* and *tsh* were present in considerable  
373 high rates in the APEC strains. In the United States, studies showed that 85,4% of the APEC  
374 strains isolated from broilers with colibacillosis were positive for at least one of the 5 principals  
375 genes (Johnson et al., 2008). Another information that must be considered is the presence of  
376 various of these genes in the microbiota of health broilers, reinforcing the suspicion that virulence  
377 genes are being found in commensal *E. coli* present in the gut of healthy avian and this can be  
378 reservoir of these genes (Collingwood et al., 2014). The detection of intestinal *E. coli* harboring  
379 numerous virulence factors may mean the appearance of potential APEC populations and their  
380 presences enhance the risk of the systemic disease (Collingwood et al., 2014). The high presence  
381 of these factors also in the poultry house and the poultry litters evidencing the ability of these  
382 bacteria to survive to hostile conditions and remain viable at the environment throughout to all  
383 steps of the production, even after disinfection and cleaning cycle, forming reservoirs of potential  
384 infection. This leads us to another question: the necessity to understand the importance of litter  
385 management to avoid the persistence of enteropathogens and the good practices of biosecurity  
386 (Smith et al., 2007).

387 About the classification of *E. coli* into the phylogroups, the majority of our strains belong  
388 to phylogroups D and A. Only four strains from APEC belongs to B2, and the others strains of  
389 this group belongs to group A. In the literature is a great consensus that ExPEC strains belong to  
390 the B2 group mostly, and less to D group in humans, and these are an important cause of urinary  
391 tract, septicemia, meningitides, abscess, peritonitis (Le Gall et al., 2007; Nandanwar et al., 2014;  
392 Pitout, 2012a). The groups A and B1 are more characterized in commensal strains (Clermont et  
393 al., 2000), and are usually more prevalent in poultry (Unno et al., 2009). It is interesting to  
394 observe that the high presence of group A among the APEC strains instead of pathotype B2 may  
395 be indicating that the infection in these animals can occurs with commensal bacteria associated  
396 with the presence of the virulence factors.

397 ERIC- PCR was use to verify if the outbreak of avian colibacillosis was being caused by a  
398 single clone of *E. coli* or by diversity of genotypes. This methodology was also use by other  
399 authors to type *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from poultry (Carvalho de Moura, Irino, and  
400 Vidotto, 2012; Da Silveira et al., 2002; Ngeleka et al., 1996). The dendrogram of our 17  
401 representative strains showed that the isolates were group into four main clusters (E1, E2, E3 and

402 E4) with 80% of similarity, showing a high genetic diversity between the strains, suggesting that  
403 not just one, but several clones were present and widespread in the breeding environment. The  
404 ERIC-PCR grouped the APEC isolates together, but into two distant and different clonal groups  
405 (E1 and E4) showing that there was no prevalent clone causing the disease, and separated from  
406 “commensal strains” (E2 and E3), that are distributed into others clones, showing a varied genetic  
407 background and proving the genetic variability of these strains. Our results seem to be in  
408 agreement with previous cited study about avian *Escherichia coli* which showed that pathogenic  
409 and non-pathogenic isolates were grouped in different clusters (Da Silveira et al., 2002).  
410

## 411 **CONCLUSION**

412 The results of our study demonstrate a emergence of multi-drug resistant strains of *E. coli*  
413 exhibiting a high rate of extend spectrum cephalosporins resistance genes, especially CTX-M-1,  
414 disseminated in the poultry pyramid production at the farm, and also the presence of one sample  
415 carrying the *mcr-1* gene, that confers plasmid resistance to colistin. Most of this isolates carry a  
416 combination of many virulence associate genes and some of this *E. coli* very pathogenic causing  
417 an outbreak of avian colibacillosis that showed not to be cause by a single clonal strain. The  
418 possible dissemination of these genes into different sources of the production chain can be due to  
419 genetic transfer through mobile genetic elements, alerting to zoonotic risk. Methods of molecular  
420 detection of virulence genes to rapid diagnosis avian colibacillosis in poultry farms can be a way  
421 to control the appearance of this disease bordering the problems and costs deriving from there,  
422 and also limiting and monitoring the use of certain antimicrobials in production may be an  
423 effective strategy to reduce the frequency of resistant bacteria in food producing animal and the  
424 dissemination of resistance genes.  
425

## 426 **Conflict of interest**

427 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
428 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 429 **Funding**

430 Thanks to CAPES for the use of financial facilities and to and Postgraduate Program in  
431 Microbiology of Universidade Estadual de Londrina.  
432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443 **REFERENCES**

444

445 Abreu, R., Castro, B., Espigares, E., Rodríguez-Álvarez, C., Lecuona, M., Arias, A. et al. (2014).  
 446 Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains.  
 447 *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (11): 868–73. doi:10.1089/fpd.2014.1796.

448 Arlet, G., and Philippon, A. (1991). Construction by polymerase chain reaction and use of  
 449 intragenic dna probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV,  
 450 CARB). *FEMS Microbiology Letters* 66 (1): 19–25.

451 Barbieri, N.L., Oliveira, A. L., Tejkowski, T.M., Pavanelo, D.B., Matter, L. B., Pinheiro, R.S., et  
 452 al. (2015). Molecular characterization and clonal relationships among *Escherichia coli* strains  
 453 isolated from broiler chickens with colisepticemia. *Foodborne Pathogens and Disease* 12 (1):  
 454 74–83. doi:10.1089/fpd.2014.1815.

455 Bedenic, B., Randegger, C.C., Stobberingh, E., Haechler, H. (2001). Comparison of five different  
 456 methods for detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Chemotherapy*  
 457 (Florence, Italy) 13 (1): 24–33. doi:10.1179/joc.2001.13.1.24.

458 Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C. M. (2011).  
 459 *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal  
 460 pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 62 (1): 1–10.  
 461 doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x.

462 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instru o normativa N  26, de 9  
 463 de julho de 2009. Available on: [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalha](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284)  
 464 [Ato.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284)

465 Carvalho de Moura, A., Irino, K., Vidotto, M.C. (2012). Genetic variability of avian *Escherichia*  
 466 *coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive  
 467 extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 45 (1): 173–81.  
 468 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11332479>.

469 Clermont, O., Cristenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia*  
 470 *coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-  
 471 groups. *Environmental Microbiology Reports* 5(1): 58–65, doi: 10.1111/1758-2229.12019.

472 Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Bonacorsi, P., (2000). Rapid and simple determination of  
 473 the *Escherichia coli* phylogenetic group rapid and simple determination of the *Escherichia coli*  
 474 phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10): 4555–58.  
 475 doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.Updated

476 CLSI, 2015. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth*  
 477 *Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. (Wayne, PA).

478 CLSI, 2008. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for*  
 479 *Bacterial Isolated from Animals*, Approved Standard-Third Edition. CLSI Document M31-A3  
 480 28, pp. 1–95. (Wayne, PA).

481 Collingwood, C., Kemmett, K., Williams, N., and Wigley, P. (2014). Is the concept of avian  
 482 pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed?. *Frontiers in*  
 483 *Veterinary Science* 1 (October). Frontiers: 5. doi:10.3389/fvets.2014.00005.

484 Da Silva, K.C., Cunha, M.P.V., Cerdeira, L., Oliveira, M.G.X., Oliveira, M.C.V., Gomes, C.R., et

- 485 al. (2016). High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia*  
 486 *coli* strains isolated from commercial turkeys. *Diagnostic Microbiology and Infectious*  
 487 *Disease*, October. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001.
- 488 Da Silveira, W.D., Ferreira, A., Lancellotti, M., Barbosa, I. A.G. C. D., Leite, D.S., De Castro,  
 489 A.F.P. et al. (2002). Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by  
 490 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Veterinary Microbiology* 89 (4):  
 491 323–28. doi:10.1016/S0378-1135(02)00256-0.
- 492 Dierikx, C. M., Van Der Goot, J.A., Smith, H.E., Kant, A., Mevius, D.J.(2013). Presence of  
 493 ESBL /AmpC - producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid : A descriptive  
 494 study. *PLoS ONE* 8 (11). doi:10.1371/journal.pone.0079005.
- 495 Dierikx, C., Van der Goot, J., Fabri, T., Van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D. (2013).  
 496 Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and ampc- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch  
 497 broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (1): 60–67.  
 498 doi:10.1093/jac/dks349.
- 499 Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R. (2000).  
 500 Relationship between the *tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and  
 501 localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infection and Immunity* 68 (7): 4145–54.  
 502 doi:10.1128/IAI.68.7.4145-4154.2000.
- 503 Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., King L.Ng., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.M. et al. (2010).  
 504 Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar heidelberg from chicken meat and humans  
 505 in Canada. *Emerging Infectious Diseases* 16 (1): 48–54. doi:10.3201/eid1601.090729.
- 506 EUCAST, 2013. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. EUCAST  
 507 guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or  
 508 epidemiological importance. Version 1.0, December 2013.
- 509 Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler L.H. (2012a). Extended-spectrum  $\beta$ -  
 510 lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion  
 511 animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology*  
 512 *and Infection* 18 (7). European Society of Clinical Infectious Diseases: 646–55.  
 513 doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x.
- 514 Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H. (2004). Molecular epidemiology  
 515 of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry.  
 516 *Veterinary Microbiology* 104 (1–2): 91–101. doi:10.1016/j.vetmic.2004.09.008.
- 517 Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E.M., Laturnus, C. et al. (2007). Avian  
 518 pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely  
 519 related are they?. *International Journal of Medical Microbiology* 297 (3): 163–76.  
 520 doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.003.
- 521 Fendri, I., Hassena, A.B., Grosset, N., Barkallah, M., Khannous, I., Chuat, V., et al. (2012).  
 522 Genetic diversity of food-isolated *Salmonella* strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis  
 523 (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). *PLoS ONE* 8:  
 524 e81315–e81315. doi: 10.1371/journal.pone.0081315
- 525 Fernandes, M.R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K.C., Cunha, M.P., Lincopan, N. (2016). Silent  
 526 dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the

- 527 global spread of the *mcr-1* gene. *EuroSurveillance* 21(17). doi: [http://dx.doi.org/10.2807/1560-](http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214)  
528 7917.ES.2016.21.17.30214
- 529 Ferreira, J.C., Casarin, R.A.P.F., Andrade, L.N., Junior, A.B., and Darini, A.L.C. (2014).  
530 IncII/ST113 and IncII/ST114 conjugative plasmids carrying bla<sub>CTX-M-8</sub> in *Escherichia coli*  
531 isolated from poultry in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 80 (4).  
532 Elsevier Inc.: 304–6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.012.
- 533 Freitag, C., Michael, G. B., Kadlec, K., Hassel, M., and Schwarz, S. (2016). Detection of plasmid-  
534 borne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine  
535 mastitis. *Veterinary Microbiology* 200: 151-56. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.010
- 536 Geser, N., Stephan, R., and Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-  
537 spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals,  
538 minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research* 8 (1):21. doi:10.1186/1746-6148-8-21.
- 539 Guabiraba, R., and Schouler, C. (2015). Avian Colibacillosis: still many black holes. *FEMS*  
540 *Microbiology Letters* 362 (15): fnv118. doi:10.1093/femsle/fnv118.
- 541 Gyles, C. L. (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health*  
542 *Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 9 (2): 149–58.  
543 doi:10.1017/S1466252308001552.
- 544 Ibrahim, D. R, Dodd, E.E.R., Stekel, D.J., Ramsden, S.J., and Hobman, J.L. (2016). Multidrug  
545 resistant, extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a  
546 dairy farm. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 1–13. doi:10.1093/femsec/fiw013.
- 547 Jacoby, G. A., and Sutton, L. (1991). Properties of plasmids responsible for production of  
548 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (1): 164–69.  
549 doi:10.1128/AAC.35.1.164.
- 550 Jacoby, G. A., and Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical  
551 isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical*  
552 *Microbiology*, 34(4), 908-911.
- 553 Jiang, H.X., Lü, D.H., Chen, Z.L., Wang, X.M., Chen, J.R., Liu, Y.H., et al. (2011). High  
554 prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and  
555 poultry in china. *Veterinary Journal* 187 (1). Elsevier Ltd: 99–103.  
556 doi:10.1016/j.tvjl.2009.10.017.
- 557 Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K.  
558 (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for  
559 use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (12): 3987–96.  
560 doi:10.1128/JCM.00816-08.
- 561 Kilani, H., Abbassi, M.S., Ferjani, S., and Mansouri, R. (2015). Virulence genes in avian ESBL-  
562 producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Frontiers in Cellular and Infection in*  
563 *Microbiology* 5(38):1–8. doi:10.3389/fcimb.2015.00038.
- 564 Kobayashi, R. K. T., Aquino, I., Ferreira, A.L.S., and Vidotto, M.C. (2011). Ecor phylogenetic  
565 analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia*  
566 *coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. *Foodborne Pathogens and*  
567 *Disease* 8 (5): 631–34. doi:10.1089/fpd.2010.0726.

- 568 Koga, V. L., Rodrigues, G.R., Scandorieiro, S., Vespero, E.C., Oba, A., Kobayashi, R.K.T, et al.  
569 (2015a). Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains  
570 isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens  
571 and Disease* 12 (6): 479–85. doi:10.1089/fpd.2014.1888.
- 572 Koga, V. L., Scandorieiro, S., Vespero, E.C., Oba, A., De Brito, B.G., Kobayashi, R.K.T., et al.  
573 (2015b). Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli*  
574 isolated from conventional and free-range poultry. *BioMed Research International* vol. 2015, 8  
575 Pages. doi:10.1155/2015/618752.
- 576 Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., & Akiba, M. (2016). Colistin-  
577 resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007–2014. *Emerging  
578 Infectious Diseases* 22(7), 1315–1317. doi: 10.3201/eid2207.160234.
- 580 Laube, H., Friese, A., Von Salviati, C., Guerra, B., and Rösler, U. (2014). Transmission of  
581 ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas.  
582 *Veterinary Microbiology* 172 (3–4): 519–27. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.008.
- 583 Le Gall, T., Clermont, O, Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenaillon, O.  
584 (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2  
585 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution* 24 (11): 2373–  
586 84. doi:10.1093/molbev/msm172.
- 587 Li, Y., Chen, L., Wu, X., and Huo, S. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant  
588 avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science* 94 (4):  
589 601–11. doi:10.3382/ps/pev008.
- 590 Liu, X., Liu, H., Li, Y., and Hao, C. (2016). High prevalence of  $\beta$ -lactamase and plasmid-  
591 mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia*  
592 *coli* from dogs in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology* 7: 1–9.  
593 doi:10.3389/fmicb.2016.01843.
- 594 Lu, Y., Wu, C.M., Wu, C.J., Zhao, H.Y., He, T., Cao, X.Y., et al. (2011). Prevalence of  
595 antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from chicken in China. *Foodborne  
596 Pathogens and Disease* 8 (1): 45–53. doi:10.1089/fpd.2010.0605.
- 597 Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections,  
598 zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (11):  
599 916–32. doi:10.1089/fpd.2013.1533.
- 600 Mora, A., Viso, S. López, C., Alonso, M.P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., et al.  
601 (2013). poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-  
602 ST95 in humans. *Veterinary Microbiology* 167 (3–4): 506–12.  
603 doi:10.1016/j.vetmic.2013.08.007.
- 604 Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P.,  
605 Rasschaert, D., and Schouler, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of  
606 avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence  
607 patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (10): 3366–76. doi:10.1128/JCM.00037-07.
- 608 Nandanwar, N., Janssen, T., Kühn, M., Ahmed, N., Ewers, C., and Wieler, L.H. (2014).  
609 Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to  
610 sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. *International*

- 611 *Journal of Medical Microbiology* 304 (7). Elsevier GmbH.: 835–42.  
612 doi:10.1016/j.ijmm.2014.06.009.
- 613 Ngeleka, M., Kwaga, J.K.P., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., et al.(1996). *Escherichia*  
614 *coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-  
615 associated factors of isolates from diseased avian. *Infection and Immunity* 64 (8): 3118–26.
- 616 Obeng, A.S., Rickard, H., Ndi, O., Sexton, M., and Barton, M. (2012). Antibiotic resistance,  
617 phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of  
618 intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology* 154 (3–4). Elsevier B.V.:  
619 305–15. doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.010.
- 620 Oh, J. Y., Kang, M.S., Kim, J.M., An, B.K., Song, E.A., Kim, J.Y., et al.. (2011). Characterization  
621 of *Escherichia coli* isolates from laying hens with colibacillosis on 2 commercial egg-  
622 producing farms in Korea. *Poultry Science* 90 (9): 1948–54. doi:10.3382/ps.2011-01509.
- 623 Pasquali, F., Lucchi, A., Braggio, S., Giovanardi, D., Franchini, A., Stonfer, M. et al.(2015).  
624 Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an  
625 integrated poultry production chain. *Veterinary Microbiology* 178 (3–4): 230–37.  
626 doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.007.
- 627 Pérez-Pérez, J. F., and Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-  
628 lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*  
629 40 (6): 2153–62.
- 630 Persoons, D., Dewulf, J., Smet, A., Herman, L., Heyndrickx, M., Martel, A., et al. (2012).  
631 Antimicrobial use in belgian broiler production. *Preventive Veterinary Medicine* 105 (4).  
632 Elsevier B.V.: 320–25. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.02.020.
- 633 Pitout, J. D. D. (2012a). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence  
634 with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 3, 9. doi:10.3389/fmicb.2012.00009.
- 635 Pitout, J. D. D. (2012b). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : An update on antimicrobial  
636 resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10(10),  
637 1165–76.
- 638 Randall, L. P., Clouting, C., Horton, R.A, Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A. et al.  
639 (2011). Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and  
640 TEM-52) from broiler chickens and turkeys in great britain between 2006 and 2009. *Journal of*  
641 *Antimicrobial Chemotherapy* 66 (1): 86–95. doi:10.1093/jac/dkq396.
- 642 Riccobono, E., Pallecchi, L., Mantella, A., Bartalesi, F., Zeballos, I.C., Trigoso, C. et al.(2012).  
643 Carriage of antibiotic-resistant *Escherichia coli* Among healthy children and home-raised  
644 chickens. *Microbial Drug Resistance* 18 (1): 10–13. doi:10.1089/mdr.2011.0003.
- 645 Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., et al. (2012). Diagnostic  
646 strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence  
647 genes. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (5): 1673–78. doi:10.1128/JCM.05057-11.
- 648 Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V., and Endimiani, A. (2013). Extended-spectrum  
649 cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human  
650 health?. *Drug Resistance Updates* 16 (1–2). Elsevier Ltd: 22–45.  
651 doi:10.1016/j.drug.2012.12.001.

- 652 Simoneit, C., Burow, E., Tenhagen, B.A., and Käsbohrer, A. (2015). Oral administration of  
653 antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken – a systematic review.  
654 *Preventive Veterinary Medicine* 118: 1–7. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.11.010.
- 655 Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., et al. (2010). Broad-  
656 spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility  
657 and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-  
658 6976.2009.00198.x.
- 659 Smith, J. L., Drum, D. J. V., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., et al. (2007). Impact of  
660 antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains  
661 colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (5): 1404–14.  
662 doi:10.1128/AEM.01193-06.
- 663 Solà-Ginés, M., Cameron-Veas, K., Badiola, I., Dolz, R., Majó, N., Dahbi, G., et al. (2015).  
664 Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks  
665 of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. *PLoS ONE* 10 (11): 1–14.  
666 doi:10.1371/journal.pone.0143191.
- 667 Tivendale, K. A., Logue, C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., et al. (2010).  
668 Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and  
669 are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity* 78 (8):  
670 3412–19. doi:10.1128/IAI.00347-10.
- 671 Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S.N., Ko, G., Ha, Y.C., et al. (2009). Absence of *Escherichia coli*  
672 phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam province,  
673 Republic of Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (17): 5659–66.  
674 doi:10.1128/AEM.00443-09.
- 675 Van Den Bogaard, A. E., and Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics:  
676 links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14 (4): 327–  
677 35. doi:10.1016/S0924-8579(00)00145-X.
- 678 Vanni, M., Meucci, V., Tognetti, R., Cagnardi, P., Montesissa, C., Piccirillo, A., et al. (2014).  
679 Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of gyra and parC quinolone  
680 resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poultry Science* 93  
681 (4): 856–63. doi:10.3382/ps.2013-03627.
- 682 Versalovic, J., Koeuth, T., McCabe, E.R.B., and Lupski, J.R. (1991). Use of the polymerase chain  
683 reaction for physical mapping of *Escherichia coli* genes. *Journal of Bacteriology* 173 (17):  
684 5253–55.
- 685 Vespero, E.C., Perugini, M.R.E., Saridakis, H.O. (2007). Screening and confirmatory assays for  
686 detection of ESBLs (extended spectrum  $\beta$ -lactamases) production by *Klebsiella pneumoniae*  
687 isolates. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 28 (1): 33-38. doi: 10.5433/1679-  
688 0367.2007v28n1p33.
- 689 Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., et al. (2004).  
690 Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -  
691 lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (4): 735–43.  
692 doi:10.1093/jac/dkh424.
- 693 Zanatta, G. F., Kanashiro, A.M.I., Castro, A.G.M., Cardoso, A. L. S. P., Tessari, E.N.C., and

694 Pulici, S.C.P. (2004). Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a  
695 antimicrobianos. *Arquivo Instituto Biológico* 71 (3): 283–86.

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723 **Figure and Table Legends**

724 **FIGURE 1| Prevalence of virulence factors among the strains of *E. coli* isolated.**

725

726 **FIGURE 2| Phenotypical profile of resistance to antimicrobials in the strains of *E. coli***  
727 **isolate from the Poultry litter, sick broilers, microbiota and poultry house.**

728

729 **FIGURE 3| Representative fingerprinting analyses of *Escherichia coli* isolates from the**  
730 **different sources obtained from ERIC-PCR. Each sample is represented by a number of**  
731 **identification (ID). The phylogenetic classification (CF) and de clonal groups (E1, E2, E3,**  
732 **E4) are also identified.**

733

734 **TABLE 1| Oligonucleotides primers and PCR conditions for all the genes tested**

735

736 **TABLE 2| Phylogenetic grouping among strains of *E. coli* isolated from the different sites.**

737

738 **TABLE 3| Frequency of *E.coli* resistant to different classes of antimicrobials and from the**  
739 **production of ESBL/AmpC producing *E.coli*.**

740

741 **TABLE 4| Distribution and characterization of resistance genes, virulence profile and**  
742 **phylogenetic classification of all isolates.**

TABLE 1| Oligonucleotides primers and PCR conditions for all the genes tested

Target gene	Primer sequences (5' - 3')	Anneling tp°	Amplicon size(pb)	References
<b>Phylogenetic groups</b>				
<i>chuA</i> -F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	59°C	288	Clermont et al., (2013)
<i>chuA</i> -R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i> - F	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	59°C	211	Clermont et al., (2013)
<i>yjaA</i> -R	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
<i>arpA</i> - F	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	59°C	400	Clermont et al., (2013)
<i>arpA</i> - R	TCTCCCCATAACCGTACGCTA			
<i>arpAgpE</i> - F	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC	57°C	301	Clermont et al., (2013)
<i>arpAgpE</i> - R	GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG			
TSPE4.C2 - F	CACTATTCGTAAGGTCATCC	59°C	152	Clermont et al., (2013)
TSPE4.C2 - R	AGTTTATCGCTGCGGGTTCG			
<i>trpA</i> -F	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	59°C	219	Clermont et al., (2013)
<i>trpA</i> -R	TCTGCGCCGGTACGCCC			
<b>Virulence genes</b>				
<i>iutA</i> -F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	63°C	302	Johnson et al., (2008)
<i>iutA</i> - R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>hlyF</i> - F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	63°C	450	Johnson et al., (2008)
<i>hlyF</i> - R	GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG			
<i>iss-F</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	63°C	323	Johnson et al., (2008)
<i>iss-R</i>	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			
<i>iroN</i> -F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	63°C	533	Johnson et al., (2008)
<i>iroN</i> - R	GTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT			
<i>ompT</i> - F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	63°C	496	Johnson et al., (2008)
<i>ompT</i> -R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC			
<i>tsh- F</i>	GGTGGTGCACCTGGAGTGG	63°C	620	Dozois et al., (2000)
<i>tsh- R</i>	AGTCCAGCGTGATAGTGG			

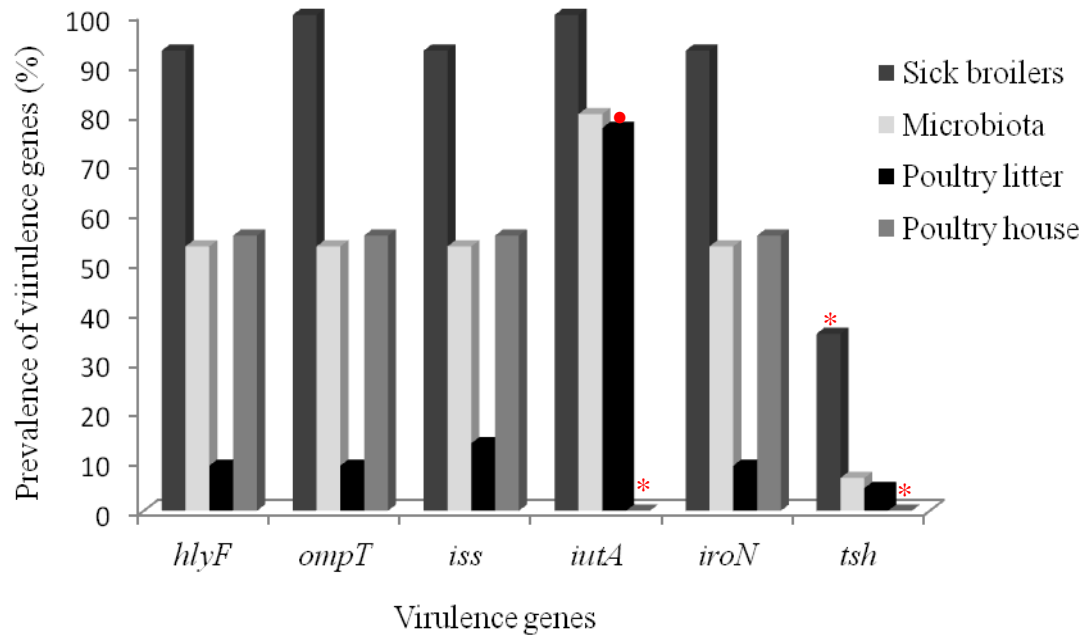
**Resistance genes**

TEM- F	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA				
TEM- R	TAATTGTTGCCGGGAAGCTA	58°C	858		Arlet and Philippon.; (1991)
SHV- F	CGCCGGGTATTCTTATTTGTCGC				
SHV- R	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	58°C	1016		Bedenic et al.; (2001)
CTX-M1- F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC				
CTX-M1- R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	52°C	415		Woodford et al.; (2005)
CTX-M2-F	CGACGCTACCCCTGCTATT				
CTX-M2- R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	52°C	552		Woodford et al.; (2005)
CTX-M8- F	TCGCGTTAAGCGGATGATGC				
CTX-M8- R	AACCCACGATGTGGGTAGC	52°C	666		Woodford et al.; (2005)
CTX-M9- F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG				
CTX-M9- R	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	52°C	205		Woodford et al.; (2005)
CTX-M25-F	GCACGATGACATTCGGG				
CTX-M25- R	AACCCACGATGTGGGTAGC	52°C	327		Woodford et al.; (2005)
CIT- F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA				
CIT- R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	64°C	462		Pérez-Pérez and Hanson.; (2002)
MOX- F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT				
MOX – R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	64°C	520		Pérez-Pérez and Hanson (2002)
FOX- F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG				
FOX- R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	64°C	190		Pérez-Pérez and Hanson (2002)
ACC- F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA				
ACC- R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	64°C	346		Pérez-Pérez and Hanson (2002)
DHA- F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT				
DHA- R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	64°C	405		Pérez-Pérez and Hanson (2002)
EBC- F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG				
EBC- R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	64°C	302		Pérez-Pérez and Hanson (2002)
MCR-1-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	58°C			Liu et al.; (2016)
MCR-1-R	CTTGGTCCGTCTGTAGGG	58°C	309		Liu et al.; (2016)

**TABLE 2| Phylogenetic grouping among strains of *E. coli* isolated from the different sites.**

Sites of isolation	Phylogenetic groups/Isolates (%)			
	A	B1	B2	D
Poultry litter	7 (31.8)	2 (9)	0 (0)	13 (59)*
Sick broilers	9 (64.2)*	0 (0)	4 (28.5)	1 (7.1)
Microbiota	1 (6.6)	9 (60)*	0 (0)	5 (33.3)*
Poultry house	5 (55.5)*	0 (0)	0(0)	4 (44.4)*
Total	22 (36.6%)	11(18.3%)	4 (6.66%)	23(38.3%)

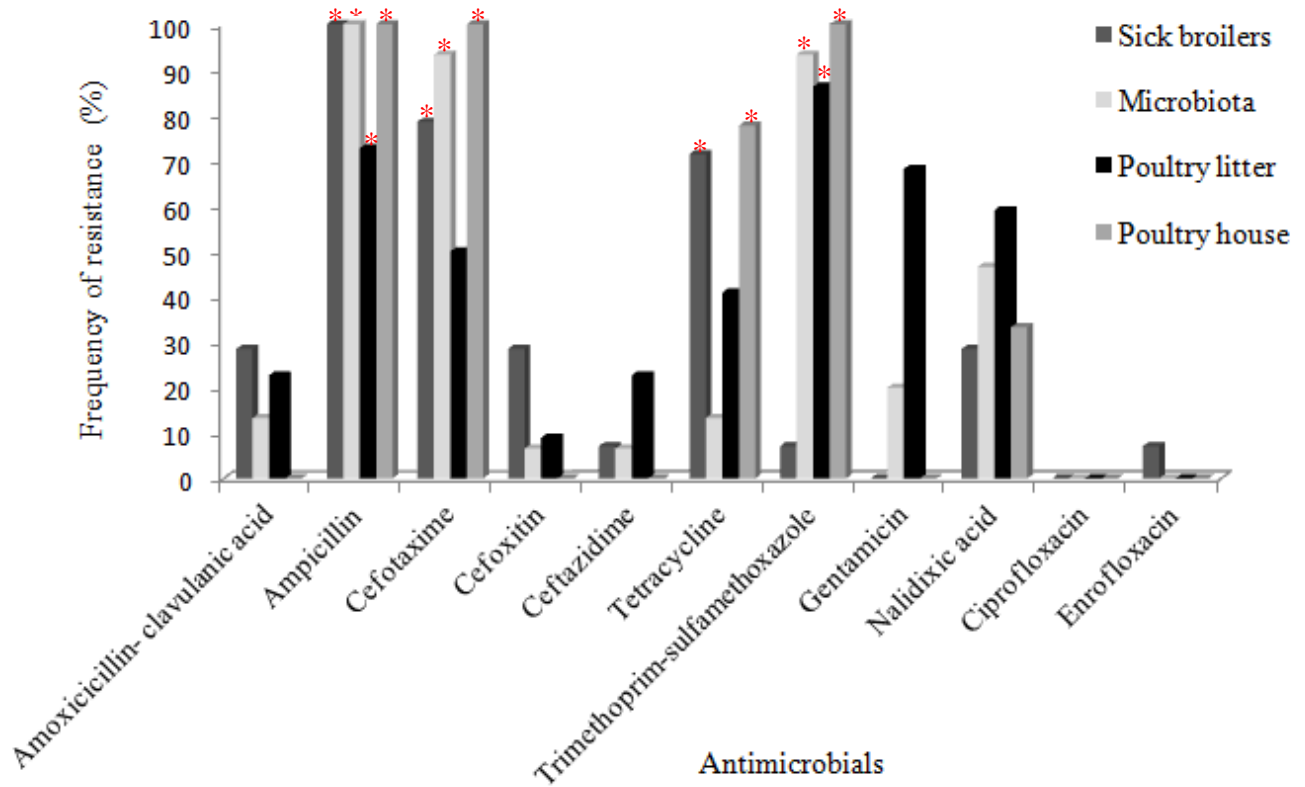
\*Significative difference p value < 0,05



**FIGURE 1| Prevalence of virulence factors among the strains of *E. coli* isolated.**

\* Lower frequency (p value <0,05)

• Higher frequency (p value <0,05)



**FIGURE 2| Phenotypical profile of resistance to antimicrobials in the strains of *E. coli* isolate from the Poultry litter, sick broilers, microbiota and poultry house.**

\*Significative difference (p value < 0,05)

**TABLE 3| Frequency of *E.coli* resistant to different classes of antimicrobials and from the production of ESBL/AmpC producing *E.coli*.**

<b>Antibiotic resistance classes</b>	<b>Sick broilers N° strains (%)</b>	<b>Microbiota N° strains (%)</b>	<b>Poultry litter N° strains (%)</b>	<b>Poultry house N° strains (%)</b>	<b>Total n=60 (%)</b>
No resistance detected	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Resistant to 1 class of antimicrobials	1 (7.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)
Resistant to 2 class of antimicrobials	11 (78.5)	4 (26.6)	3 (13.6)	2 (22.2)	20 (33.3)
Resistant to 3 class of antimicrobials	1 (7.1)	10 (66.6)	10 (45.4)	4 (44.4)	25 (41.6)
Resistant to 4 class of antimicrobials	1 (7.1)	1 (6.6)	9 (40.9)	3 (33.3)	14 (23.3)
Production of ESBL/AmpC	14 (100)	13 (87)	11 (50)	9 (100)	47 (78.3)

**TABLE 4| Distribution and characterization of resistance genes, virulence profile and phylogenetic classification of all isolates.**

<b>N° of isolate</b>	<b>Site of origin</b>	<b>Phylogenetic group</b>	<b>Virulence gene profile</b>	<b>Resistance genes</b>
1	Poultry house	D	None	Group 1 CTX-M
2	Poultry house	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	Group 1 CTX- M
3	Poultry house	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	Group 1 CTX- M
4	Poultry house	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	Group 1 CTX- M
5	Poultry house	D	None	Group 1 CTX- M, TEM
6	Poultry house	A	None	Group 1 CTX- M
7	Poultry house	A	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	Group 1 CTX- M
8	Poultry house	D	None	Group 1 CTX- M
9	Poultry house	D	<i>hlyF, ompT, iss, iroN</i>	Group 1 CTX-M, TEM
10	Sick broilers	B2	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	Group 1 CTX-M, CIT
11	Sick broilers	B2	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group 2 CTX-M
12	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
13	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
14	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	Group 1 CTX-M
15	Sick broilers	D	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	Group 1 CTX-M
16	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
17	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
18	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
19	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	Group 1 CTX-M
20	Sick broilers	A	<i>ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
21	Sick broilers	B2	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	CIT
22	Sick broilers	B2	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	CIT

<b>23</b>	Sick broilers	A	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M
<b>24</b>	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M, TEM
<b>25</b>	Microbiota	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
<b>26</b>	Microbiota	D	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN, tsh</i>	Group 2 CTX-M
<b>27</b>	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M, TEM
<b>28</b>	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M, TEM
<b>29</b>	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iroN</i>	Group 1 CTX-M, TEM
<b>30</b>	Microbiota	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M

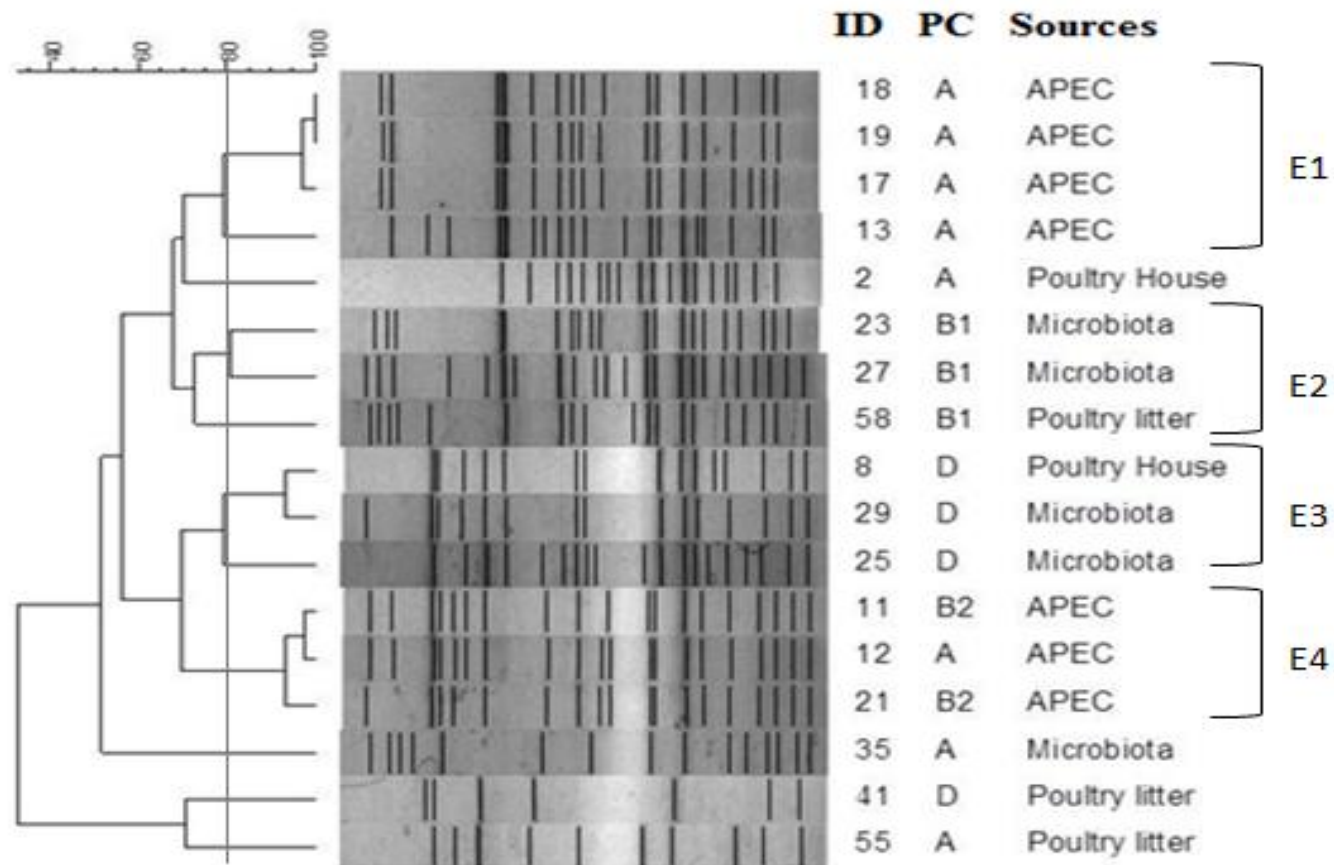
---

TABLE 4| Continued

N° of isolate	Site of origin	Phylogenetic group	Virulence gene profile	Resistance genes
31	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iron</i>	Group 1 CTX-M, TEM
32	Microbiota	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
33	Microbiota	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
34	Microbiota	B1	None	Group 1 CTX-M
35	Microbiota	B1	None	Group 1 CTX-M
36	Microbiota	A	None	Group 2 CTX-M, CIT
37	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iron</i>	Group 2 CTX-M, TEM
38	Microbiota	B1	<i>hlyF, ompT, iss, iutA, iron</i>	Group 1 CTX-M, TEM
39	Poultry litter	A	None	None
40	Poultry litter	A	<i>iss, iutA</i>	None
41	Poultry litter	A	<i>iutA</i>	None
42	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	CIT
43	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	None
44	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	CIT
45	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
46	Poultry litter	D	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	Group 2 CTX-M
47	Poultry litter	D	<i>iss, iutA, iron, tsh</i>	Group 1 CTX-M
48	Poultry litter	A	None	Group 1 CTX-M
49	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
50	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
51	Poultry litter	D	<i>iss, iutA, iron</i>	None

<b>52</b>	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
<b>53</b>	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M. <i>mcr-1</i>
<b>54</b>	Poultry litter	D	<i>iutA</i>	Group 1 CTX-M
<b>55</b>	Poultry litter	A	<i>iutA</i>	CIT
<b>56</b>	Poultry litter	A	<i>iutA</i>	CIT
<b>57</b>	Poultry litter	A	<i>hlyF, ompT, iutA</i>	CIT
<b>59</b>	Poultry litter	D	None	Group 1 CTX-M
<b>59</b>	Poultry litter	B1	None	None
<b>60</b>	Poultry litter	B1	None	Group 1 CTX-M

---



**FIGURE 3|** Representative fingerprinting analyses of *Escherichia coli* isolates from the different sources obtained from ERIC-PCR. Each sample is represented by a number of identification (ID). The phylogenetic classification (CF) and de clonal groups (E1, E2, E3, E4) are also identified.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Há a presença de genes codificadores de fatores de virulência em todos os grupos testados, com predominância nos grupo dos frangos doentes, evidenciando a disseminação desses genes nos animais e no ambiente.
- Houve uma alta incidência de resistência a todas as classes de antimicrobianos testados, exceto ciprofloxacina e enrofloxacin que apresentaram elevada taxa de sensibilidade, independente da origem da amostra.
- Houve maior incidência de multirresistência em mais da metade das amostras, especialmente na cama de frango, nos galpões e na microbiota, sendo que no grupo dos frangos doentes este índice foi menor.
- Foram encontradas amostras produtoras de ESBL. Entre elas, o grupo mais prevalente foi o CTX-M-1. O gene *mcr-1*, que confere resistência plasmidial a colistina foi encontrado em uma amostra pertencente a cama de frango
- A metodologia do ERIC-PCR mostrou uma diversidade genética nos isolados de *E. coli* presentes na cadeia de produção da fazenda, e também que o surto de colibacilose não foi causado por um único clone prevalente, sendo 4 grupos predominantes (E1-E4) principais a 80% de similaridade com as 17 amostras representativas testadas. Estes foram agrupados principalmente devido a similaridade de seus genomas.