



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Giulia Von Tönnemann Pilati

Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* e genes de resistência associados a bacteriófagos em frangos de corte da avicultura brasileira

Florianópolis
2023

Giulia Von Tönnemann Pilati

Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* e genes de resistência associados a bacteriófagos em frangos de corte da avicultura brasileira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gislaine Fongaro

Florianópolis

2023

Pilati, Giulia Von Tönnemann

Isolamento e caracterização de Escherichia coli e genes de resistência associados a bacteriófagos em frangos de corte da avicultura brasileira / Giulia Von Tönnemann Pilati ; orientador, Gislaine Fongaro, 2023.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Escherichia coli. 3. Colibacilose. 4. Avicultura. 5. Bacteriófagos. I. Fongaro, Gislaine. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Giulia Von Tönnemann Pilati

Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* e genes de resistência associados a bacteriófagos em frangos de corte da avicultura brasileira

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 10 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Fabienne Antunes Ferreira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jorge Augusto Petroli Marchesi, Dr.
MercoLab Laboratórios LTDA

Prof.^a Patricia Hermes Stoco, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro Suplente)

Prof.^a Claudia Pies Biffi, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro Suplente)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Prof.^a Gislaine Fongaro, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e meu irmão, pois são eles que me apoiam e me motivam a ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de evoluir e trilhar meu caminho até aqui, ao lado de tantas pessoas especiais.

Aos meus pais, que são minha base e meus exemplos de vida. Obrigada por me incentivarem a nunca parar. Mãe, obrigada pela sua dedicação à família, por me ouvir, acolher, acalmar, animar e principalmente por me apoiar. E ao meu pai, obrigada por seu meu maior exemplo de profissional e por me ensinar a levar a vida de uma forma leve. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, pelos momentos compartilhados, conselhos e por estar sempre comigo, tenho orgulho de acompanhar tua trajetória e ver a pessoa que se tornou. À minha madrinha Mônica, por ser tão amorosa e sempre se fazer presente. E à minha família, por todo apoio e amor, mesmo quando separados pela distância.

À Prof^ª. Dra. Claudia Biffi e ao Gleidson Salles, por serem exemplo de profissionais. Sou grata por confiarem em mim e por terem me proporcionado essa oportunidade.

À minha orientadora, Gislane, por ser exemplo de força, dedicação e determinação. Gis, obrigada por todo o carinho, por ter me recebido de braços abertos, ter confiado em mim e por proporcionar tantas oportunidades incríveis ao longo deste caminho.

Às professoras Dra. Ariadne e Dra. Izabella, meu agradecimento pela dedicação, suporte, principalmente nos últimos meses, conselhos e conversas.

À família LVA, sou grata a vida por cruzar meu caminho com o de pessoas tão incríveis, que tornaram essa caminhada imensamente mais leve.

Bea, obrigada por ter me recebido tão bem desde o dia em que cheguei no LVA. Por ter me acompanhado nas idas em aeroporto, por todas as noites, sábados e feriados processando material ou isolando bactéria. Por ter esse teu jeito leve, acolhedor, amoroso e sincero.

À Cati, por ser tão companheira, dedicada e resiliente. Pelos momentos vividos e risadas compartilhadas, e por ser uma pessoa incrível, és um exemplo para mim.

Iara, obrigada por ter me recebido e me acolhido na tua casa. Obrigada por todos os momentos compartilhados, por sempre me ouvir, por ser essa pessoa sensível, doce e companheira com a capacidade de tornar qualquer situação mais leve.

Isa, obrigada por ser essa pessoa tão companheira e prestativa, sempre pronta para uma passada no bar e fazer qualquer cálculo se tornar extremamente fácil. Obrigada por todas as voltas para casa e por todas as conversas no trajeto de 10 minutos.

Mari, sou grata por compartilhar os últimos dois anos contigo. Obrigada por todas as conversas e desabafos, experimentos compartilhados, por todas as risadas, por ser uma companheira de viagem (e perrengues) incrível, e, principalmente, pela oportunidade de te conhecer e ver o ser humano incrível que és.

Mari Dahmer, sou grata de ter te conhecido e convivido contigo, obrigada por ser tão paciente, parceira e por abraçar esse trabalho. Obrigada pelas inúmeras horas de conversa e risadas durante as extrações e PCRs. Me sinto privilegiada de ter aprendido o que sei contigo.

Ao Rafa, por todas as conversas aleatórias e, ao mesmo tempo, profundas, por todas as risadas e piadas, pelas cervejas e amendoins e por ter a capacidade de tornar qualquer situação mais leve. Obrigada por ter me ouvido e aconselhado quando mais precisava.

À Doris, por ser essa pessoa tão doce, acolhedora e paciente, sou grata pela oportunidade de conviver e aprender contigo. À Helena, Julia Kinetz, Paula e Giovana obrigada por todos os momentos compartilhados. Agradeço aos demais, que de alguma forma participaram desse ciclo: Yasmin, Luíse, Estevão, Leonardo, Lucas, Viviani, Raphael.

À equipe Zoetis, em especial ao Gleidson Salles, Eduardo Correa Muniz, Josias Rodrigo Vogt e Antônio Junior de Lima Neto pela realização das coletas de forma tão organizada e por todo o suporte fornecido.

Ao Laboratório de Bioinformática, em especial ao Vilmar, por estar sempre disponível e por todo o suporte durante esse período.

À Prof^a. Dra. Fabienne, por ser tão receptiva e por todo suporte fornecido para a realização de experimentos.

Ao Dr. Jorge por ter me recebido no Mercolab e pela oportunidade de conhecer e aprender com pessoas incríveis.

Ao Dr. David Rodríguez Lázaro, por nos receber tão bem em sua casa e laboratório, e por proporcionar essa experiência tão incrível. Aos demais integrantes do laboratório, que nos receberam de braços abertos, em especial à Nadine, por ser exemplo de dedicação e ternura.

Às minhas amigas de longa data Rafa, Laura, Isadora, Duda, Letícia e Georgia por todas as trocas, os anos de amizade e por serem uma parte tão importante de minha vida, mesmo que na maioria das vezes estejamos distantes fisicamente.

Aos meus amigos da faculdade, Luana, Beatriz, Char Laura e Emmily, obrigada pelos anos de amizade, trocas e por todo apoio.

Encerro expressando minha gratidão a todos que fizeram parte da minha vida durante este período.

O que somos é consequência do que pensamos.

(Buda)

RESUMO

Escherichia coli patogênica aviária (APEC) é o patógeno causador da colibacilose, doença com manifestações localizadas ou sistêmicas. A colibacilose é uma das principais doenças que acarretam prejuízos econômicos na avicultura industrial devido à alta morbidade, mortalidade e por ser uma das principais doenças infecciosas envolvidas na condenação de carcaças de frangos. O desenvolvimento da resistência antimicrobiana é um problema crescente de preocupação mundial. Os bacteriófagos lisogênicos são vetores eficazes na aquisição e disseminação de genes de resistência a antibióticos (ARGs). Tendo em vista o exposto, este estudo visou isolar e caracterizar *Escherichia coli* patogênica aviária obtidas de carcaças de frangos necropsiados em granjas avícolas do Brasil. Para tal, foram coletadas amostras de 100 lotes de frangos de corte pertencentes aos estados do Paraná (30), Santa Catarina (15), Rio Grande do Sul (15), São Paulo (10), Minas Gerais (10) e Ceará (20), entre os meses de agosto e novembro de 2021. Para cada lote, foram coletados dez *swabs* nasotraqueais, três fígados, três baços e três fêmures de aves já necropsiadas pela rotina de inspeção. As amostras foram submetidas a isolamento bacteriano em ágar MacConkey. Os isolados de fêmures foram submetidos à reação de PCR qualitativa para detecção de genes preditores mínimos para identificação de APEC. Foi realizado teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão com discos e avaliou-se a capacidade de formação de biofilme utilizando placas de microtitulação e coloração com cristal violeta, seguido de análise em espectrofotômetro. As cepas foram classificadas em não produtoras de biofilme, produtoras de biofilme fraco, moderado ou forte, com base na densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos. Por meio de sequenciamento de genoma completo determinou-se a espécie dos isolados, o sorogrupo dos, presença de genes de virulência e de genes de resistência, dentre eles os genes associados a bacteriófagos. Os índices de resistência fenotípica encontrados foram 69,2% para Ácido Nalidíxico, 66,1% para Ampicilina, 9,2% para Azitromicina, 44,6 para Ceftiofur, 44,6% para Ceftriaxona, 38,4% para Enrofloxacina, 29,2% para Gentamicina, 19,95% para Lincomicina/Espectinomicina 9,2% para Nitrofurantoína, 13,8% para Norfloxacina e 44,6% para Sulfazotrim. Os isolados apresentaram genes de virulência ligados à patogenicidade das cepas APEC, incluindo genes de adesão, aquisição de ferro, resistência ao soro e toxinas. Genes de resistência a antimicrobianos contra classe de aminoglicosídeos foram detectados em 79,36% dos isolados, 74,6% apresentaram genes preditos de resistência a sulfonamidas, 63,49% tinham genes preditos de resistência contra β -lactâmicos, e 49,2% dos isolados possuíam pelo menos um dos genes de resistência a tetraciclinas. Entre os genes detectados, 27 já foram descritos em estudos anteriores e associados a bacteriófagos. Dos isolados testados, 71,43% demonstrou a capacidade de formar biofilme, destes 57,14% foram classificados como fracos formadores. Este estudo identificou uma prevalência de 58% de *Escherichia coli* aviária patogênica no rebanho avícola brasileiro. As cepas também apresentaram resistência antimicrobiana significativa a antibióticos amplamente utilizados na produção animal quanto no tratamento de infecções humanas. A presença de cepas multirresistentes enfatiza a importância em adotar medidas de monitoramento e farmacovigilância para conter a disseminação dessa resistência. Os resultados deste estudo ressaltam o papel dos bacteriófagos na propagação de genes de resistência antimicrobiana na indústria avícola, destacando a necessidade de estudos antimicrobianos que considerem não apenas as bactérias em si, mas também suas interações com bacteriófagos.

Palavras-chave: Colibacilose; APEC; biofilme; transferência horizontal de genes.

ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the pathogen responsible for colibacillosis, a disease with localized or systemic manifestations. Colibacillosis is one of the main diseases causing economic losses in the poultry industry due to high morbidity, mortality, and its involvement in the condemnation of chicken carcasses. The development of antimicrobial resistance is a growing global concern. Lysogenic bacteriophages are effective vectors in acquiring and disseminating antibiotic resistance genes (ARGs). This study aimed to isolate and characterize avian pathogenic *Escherichia coli* obtained from necropsied chicken carcasses in poultry farms in Brazil. Samples were collected from 100 batches of broiler chickens from the states of Paraná (30), Santa Catarina (15), Rio Grande do Sul (15), São Paulo (10), Minas Gerais (10), and Ceará (20), between August and November 2021. For each batch, ten nasotracheal swabs, three livers, three spleens, and three femurs from necropsied birds during routine inspection were collected. The samples were subjected to bacterial isolation on MacConkey agar. Femur isolates underwent qualitative PCR to detect minimal predictive genes for APEC identification. Antimicrobial sensitivity tests were performed using disc diffusion, and biofilm-forming capacity was assessed with microtiter plates and crystal violet staining, followed by spectrophotometric analysis. Complete genome sequencing determined the species of isolates, serogroups, presence of virulence genes, and resistance genes, including those associated with bacteriophages. The phenotypic resistance indices found were 69.2% for Nalidixic Acid, 66.1% for Ampicillin, 9.2% for Azithromycin, 44.6% for Ceftiofur, 44.6% for Ceftriaxone, 38.4% for Enrofloxacin, 29.2% for Gentamicin, 19.95% for Lincomycin/Espectinomycin, 9.2% for Nitrofurantoin, 13.8% for Norfloxacin, and 44.6% for Sulfamethoxazole. The isolates carried virulence genes associated with APEC pathogenicity, including adhesion, iron acquisition, serum resistance, and toxins. Antibiotic resistance genes against the aminoglycoside class were detected in 79.36% of the isolates, 74.6% presented predicted sulfonamide resistance genes, 63.49% had predicted β -lactam resistance genes, and 49.2% of isolates possessed at least one tetracycline resistance gene. Among the detected genes, 27 were previously described in studies related to bacteriophages. Out of the tested isolates, 71.43% demonstrated biofilm-forming ability, with 57.14% classified as weak formers. This study identified a 58% prevalence of pathogenic avian *Escherichia coli* in the Brazilian poultry population. The strains also exhibited significant antimicrobial resistance to antibiotics widely used in animal production and human infection treatment. The presence of multidrug-resistant strains emphasizes the importance of adopting monitoring and pharmacovigilance measures to curb the spread of this resistance. The results underscore the role of bacteriophages in propagating antimicrobial resistance genes in the poultry industry, highlighting the need for antimicrobial studies that consider not only bacteria but also their interactions with bacteriophages.

Keywords: Colibacillosis; APEC; biofilm; horizontal gene transfer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclos de Infecção dos Fagos: No ciclo lítico, a lise da célula hospedeira é a única maneira de liberar as novas partículas virais. Já no ciclo lisogênico, o ácido nucleico do fago recombina-se com o ácido nucleico da bactéria, resultando na formação de um profago. Este profago se replica com o cromossomo hospedeiro e é transferido verticalmente da célula inicialmente infectada para suas células filhas durante a divisão celular..... 35
- Figura 2– Processo de formação do biofilme. 37
- Figura 3– Desenho experimental das atividades do presente estudo, considerando: (a) Coleta amostral, isolamento de colônias características de *Escherichia coli* (fermentadoras de lactose em ágar MacConkey) de *swabs* nasotraqueais, fígado, baço e fêmures e armazenamento dos isolados em biobanco; b) Caracterização dos isolados de fêmures por PCR qualitativa para identificação e confirmação de APEC, teste de sensibilidade a antimicrobianos, avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* e sequenciamento de genoma completo..... 40
- Figura 4 – Colônia típica de *E. coli* isolada em ágar MacConkey. 48
- Figura 5 – Imagem fotográfica de gel de agarose a 1% demonstrando os cinco preditores mínimos de virulência de APEC, utilizando o marcador de PM (peso molecular) LMW e os genes *iroN* (667 pb), *ompT* (496 pb), *hlyF* (450 pb), *iss* (323 pb) e *iutA* (302 pb); C- (controle negativo); C+ (controle positivo). 51
- Figura 6 – Distribuição dos isolados de acordo com a capacidade de formação de biofilme. . 53
- Figura 7 – Resistências apresentadas pelos 63 isolados frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT). 54
- Figura 8 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Sul frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT). 55
- Figura 9 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Sudeste frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN),

Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacin (NOR) e Sulfazotrim (SUT). 56

Figura 10 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Nordeste frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacin (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacin (NOR) e Sulfazotrim (SUT). 57

Figura 11 – Distribuição dos isolados testados nos diferentes sorogrupos. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gene alvo, sequência dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e referência bibliográfica.....	44
Tabela 2 – Resultados da frequência de colônias características de <i>E. coli</i> em amostras de aves de corte produzidas no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Ceará.....	49
Tabela 3 – Prevalência de genes de virulência nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	60
Tabela 4 – Prevalência de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AFEC	<i>Escherichia coli</i> fecal aviária
aMPV	Metapneumovírus aviário
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
APEC	<i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ColBM	Plasmídeo de Colicina B e M
ColV	Plasmídeo de Colicina V
DAEC	<i>E. coli</i> de adesão difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DO	Densidade óptica
DOa	Densidade óptica da amostra
DOcn	Densidade óptica do controle negativo
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ExPEC	<i>E. coli</i> patogênica extraintestinal
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EHEC	<i>E. coli</i> produtora de enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
g	Força G
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
HGT	Transferência horizontal de genes
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa
ICE	Elementos conjugativos integrativos
InPEC	<i>E. coli</i> Patogênica de Origem Intestinal

KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
LVA	Laboratório de Virologia Aplicada
MALDI TOF - MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MGE	Elementos genéticos móveis
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MLEE	Eletroforese Enzimática Multilocus
MLST	Tipagem de Sequência Multilocus
m/z	Relação massa/carga
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
NMEC	<i>E. coli</i> causadora da meningite neonatal
NDV	Vírus da doença de Newcastle
p	<i>p-value</i> (valor-p)
PBS	Tampão fosfato-salino
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
QAC	Compostos de amônio quaternário
QC	Controle de qualidade
RefSeq	<i>Reference Sequence</i> (Banco de sequências de referência)
SCI	Síndrome da Cabeça Inchada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STEC	<i>E. coli</i> produtora de shigatoxina
U	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPEC *E. coli* uropatogênica

µg Micrograma

µL Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius

%: Por cento

®: Marca Registrada Oficial

™: Trademark (Marca registrada)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICA AVIÁRIA	23
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	24
2.3.1	Adesinas.....	25
2.3.2	Invasinas	25
2.3.3	Resistência aos sistema complemento	26
2.3.4	Sistemas de aquisição de ferro.....	27
2.3.5	Toxinas.....	28
2.3.6	Outros fatores de virulência	28
2.4	COLIBACILOSE	28
2.4.1	Formas localizadas de colibacilose.....	29
2.4.2	Formas sistêmicas de colibacilose	30
2.5	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	31
2.5.1	Antimicrobianos e o processo de resistência	31
2.5.2	Desinfetantes	33
2.5.3	Transferência horizontal de genes mediada por bacteriófagos.....	34
2.6	BIOFILMES	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COLETA DE AMOSTRAS	39
4.2	ISOLAMENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. COLI</i> POR MALDI-TOF.....	41
4.4	IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE APEC.....	42
4.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE FÊMURES.....	44
4.6	TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	45
4.7	SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO	45
4.8	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	46

4.8.1	Confirmação de espécie.....	46
4.8.2	Identificação de sorogrupo	47
4.8.3	Deteccão de genes de virulência	47
4.8.4	Deteccão de genes de resistência a antimicrobianos e desinfetantes.....	47
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	HISTÓRICO DOS LOTES	48
5.2	ISOLAMENTO DE <i>E. COLI</i>	48
5.3	MALDI-TOF PARA CONFIRMAÇÃO DE ESPÉCIE.....	49
5.4	CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DE APEC	50
5.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE FÊMURES.....	52
5.6	TESTE DE SENSIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS	54
5.7	SOROGRUPOS.....	58
5.8	DETECCÃO E DISTRIBUIÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA	60
5.9	DETECCÃO E DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES	66
5.10	GENES DE RESISTÊNCIA MEDIADOS POR BACTERÍOFAGOS	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE A – RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO DE 63 ISOLADOS DE <i>E. COLI</i>	98
	APÊNDICE B – PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS POR ISOLADO.....	103
	APÊNDICE C – DADOS BRUTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS.....	106
	APÊNDICE D – MATERIAL COMPLEMENTAR	107
	Capítulos de livros	107
	Artigos completos publicados em periódicos	107
	Resumos publicados em anais de congressos	109
	Estágios.....	110

1 INTRODUÇÃO

Em 2022, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio representou 24,8% do PIB brasileiro. O agronegócio é representado pela soma de quatro segmentos: insumos para a agropecuária, produção agropecuária básica (ou primária), agroindústria (processamento) e agrosserviços. A análise desses segmentos é realizada para os ramos agrícola e pecuário, que juntos representam o agronegócio. Enquanto o PIB do ramo agrícola teve um recuo em 2022, o ramo pecuário apresentou um crescimento de 2,11%. Nesse contexto, no ano de 2022, a produção pecuária foi impulsionada pela avicultura de corte, pela suinocultura e pela bovinocultura de corte (CEPEA, 2023).

Em 2022 a produção mundial de carne de frango foi de 101.086 milhões toneladas. O Brasil figura entre os maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2022, o Brasil produziu 14.524 milhões de toneladas de carne de frango, sendo o segundo maior produtor mundial, representando um valor bruto de 112,145 bilhões de reais. Desta produção, 66,80% foi destinada ao mercado interno e 33,20% destinada a exportações. Foram exportadas 4.822 milhões de toneladas de carne de frango, mantendo o Brasil como maior exportador mundial (ABPA, 2023).

A indústria avícola passou por significativas transformações em seus sistemas de produção. Embora os galpões onde as aves são alojadas e criadas tenham melhorado em termos de condições do bem-estar animal e incorporação de tecnologias avançadas, as densidades populacionais também aumentaram proporcionalmente. Essa evolução representa um desafio significativo em termos de saúde animal, apesar das muitas medidas adotadas, como biossegurança, imunoprofilaxia, manejo e nutrição (COLLETT *et al.*, 2020). A alta concentração de aves em um mesmo ambiente se torna um fator de risco sanitário, podendo favorecer o surgimento e disseminação de doenças, especialmente as doenças respiratórias. Além disso, as rotas de migração das aves podem contribuir para a disseminação de doenças.

A colibacilose é uma doença de manifestação local ou sistêmica. Geralmente está associada à *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), embora nem todos os casos de colibacilose sejam necessariamente causados por APEC (JOHNSON *et al.*, 2022). A colibacilose é uma das doenças mais importantes na produção avícola, pois leva a perdas econômicas significativas, devido à morbidade, mortalidade e condenação de carcaças (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NOLAN *et al.*, 2020).

Para o tratamento da colibacilose diversos agentes antimicrobianos pertencentes a diferentes classes, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosamidas, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas (IBRAHIM *et al.*, 2019a; LANDONI; ALBARELLOS, 2015; NOLAN *et al.*, 2020). Atualmente, muitos dos antimicrobianos usados na produção de aves também são empregados na medicina humana, fato que gera preocupações acerca da possível transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre animais e seres humanos (MARSHALL; LEVY, 2011).

Nos últimos anos, tem-se testemunhado um aumento na resistência a antimicrobianos, atribuído em parte à crescente pressão seletiva exercida pelo uso extensivo de antimicrobianos. Além disso, a transferência de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas contribui para a disseminação da resistência a antimicrobianos, tornando o problema ainda mais desafiador (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; REYGAERT, 2018).

Considerando a importância e o papel da avicultura brasileira, os impactos causados pela infecção por APEC e os problemas enfrentados pela resistência aos antimicrobianos, é de grande importância a caracterização de cepas de APEC visando um melhor entendimento da patogênese da colibacilose para desenvolver estratégias efetivas de prevenção e controle dessa doença. Portanto, este estudo visa determinar a prevalência de *Escherichia coli* em frangos de corte de diferentes regiões brasileiras e caracterizar os isolados obtidos dos fêmures de aves necropsiadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez em 1884 pelo microbiologista e pediatra alemão Theodor Escherich. Foi inicialmente denominada *Bacterium coli commune* e em 1919 renomeada como *Escherichia coli* (BLOUNT, 2015). *Escherichia coli* tem sido estudada desde a sua descoberta e é considerada um organismo modelo para pesquisas em microbiologia, genética e biologia molecular. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete Gram-negativo, não esporulado e anaeróbio facultativo, já que possui metabolismo respiratório e fermentativo. É mesófila, sua temperatura ideal de crescimento é 37 °C, porém pode variar de 18 a 44 °C. Devido à existência de flagelos peritríquios a maioria das cepas é móvel. Apresenta distribuição cosmopolita, e seus vários sorotipos são habitantes intestinais que ocorrem em grande número na maioria dos animais, incluindo humanos (FERREIRA; KNÖBL, 2009; YU; BANTING; NEUMANN, 2021).

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas de acordo com sua estrutura antigênica. Sua membrana externa é composta de lipopolissacarídeos (LPS) que inclui lipídio A, oligossacarídeos centrais e um polissacarídeo único, conhecido como antígeno-O. O antígeno H é de natureza proteica e forma o flagelo bacteriano quando este está presente. Os antígenos capsulares (K) e fimbriais (P) também são utilizados na tipagem sorológica, porém com menor frequência. Existem aproximadamente 180 antígenos O, 80 K, e 60 H. O antígeno O determina o sorogrupo, enquanto a adição do antígeno H e, às vezes, do antígeno K determinam o sorotipo (FRATAMICO *et al.*, 2016; NOLAN *et al.*, 2020; ORSKOV *et al.*, 1977).

Com base nos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, *E. coli* pode ser classificada em patotipos, conforme o local de infecção. São divididas em *E. coli* patogênica de origem intestinal (InPEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009). As InPEC são responsáveis por diarreias e apresentam diferentes estratégias para invasão das células intestinais. São elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de shigatoxina/enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC), todas potenciais patógenos (CROXEN; FINLAY, 2010). Já as ExPEC, dividem-se em três diferentes patotipos: *E. coli* uropatogênica (UPEC) causadora de infecções no trato urinário de humanos, *E. coli* causadora da meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC), que causa a colibacilose aviária (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A tipagem filogenética classifica as cepas de *E. coli*, principalmente as extraintestinais, conforme o filogrupo. Nesta primeira classificação, as cepas poderiam pertencer à quatro filogrupos (A, B1, B2 e D), os quais eram identificados a partir de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) triplex, baseado em dois genes (*chuA*, *yjaA*) e um fragmento de DNA anônimo (TSPE4.C2). Nesta classificação, as cepas extraintestinais virulentas pertenceriam principalmente ao grupo B2 e cepas comensais pertenceriam em sua maioria ao grupo A (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Em 2013, com o aumento dos dados de sequenciamento multilocus e genômico, a classificação passou a conter oito grupos filogenéticos: sete (A, B1, B2, C, D, E, F) pertencentes à *E. coli sensu stricto*, e o oitavo sendo o clado críptico I de *Escherichia*. Utilizando a técnica de PCR quadriplex, avaliando a presença/ausência dos genes *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2* é possível atribuir a um isolado de *E. coli* um dos oito filogrupos (CLERMONT *et al.*, 2013). Os grupos B2 e F contêm a maioria dos isolados patogênicos (NOLAN *et al.*, 2020).

Em 2019, houve uma revisão e modificação da classificação de *Escherichia coli*, já que foi identificado um grupo intermediário entre os filogrupos B2 e F, denominado filogrupo G, que inclui cepas anteriormente classificadas como pertencentes aos grupos B2 e F. A maioria das cepas APEC altamente patogênicas pertencem ao filogrupo G (CLERMONT *et al.*, 2019; NOLAN *et al.*, 2020).

A tipagem de sequência multilocus (MLST) é um método de tipagem molecular, utilizado principalmente em patógenos bacterianos. Diferente de outras abordagens de caracterização, o MLST se baseia nos princípios da genética populacional que sustentavam a técnica de eletroforese enzimática multilocus (MLEE). Em 1998 um método para analisar os polimorfismos de sete genes cromossômicos (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da bactéria *Neisseria meningitidis* foi desenvolvido (MAIDEN *et al.*, 1998). O método utiliza fragmentos de genes *housekeeping* amplificados e posteriormente submetidos ao sequenciamento (MAIDEN, 2006). Com base neste método é possível determinar se os isolados recuperados de um surto localizado de doença são indistinguíveis geneticamente e avaliar a relação entre as cepas que causam doenças em uma determinada área geográfica e cepas isoladas em diferentes partes do mundo (MAIDEN *et al.*, 1998; MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021).

Os Tipos de Sequência (STs) são equiparáveis aos Tipos Eletroforéticos (ETs) empregados em protocolos de Eletroforese Enzimática Multi-Locus (MLEE). Cada ST distinto é igualmente associado a um número singular, embora arbitrário. Cada ST caracteriza uma

sequência de nucleotídeos exclusiva e condensa uma considerável quantidade de informações provenientes de sequências de nucleotídeos (MAIDEN, 2006).

No caso das linhagens ExPEC, a abordagem mostra-se útil na identificação de cepas envolvidas em surtos, particularmente na identificação de linhagens associadas a surtos de colibacilose aviária (NOLAN *et al.*, 2020). Algumas linhagens de ExPEC são consideradas pandêmicas e têm importância global para a saúde humana e animal. Essas linhagens demonstram um processo evolutivo caracterizado por alta virulência, resistência antimicrobiana, potencial pandêmico e persistência da infecção.

As linhagens ExPEC descritas como epidêmicas são ST-131, ST-95, ST-69, ST-73 e ST-648 (XIA *et al.*, 2022). As principais linhagens relacionadas a cepas APEC altamente patogênicas são ST-23, ST-117, ST-95, ST-140, ST-428/429, ST-131 e ST-355 (JOHNSON *et al.*, 2022; MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021).

2.2 *Escherichia coli* patogênica aviária

Escherichia coli patogênica aviária é o patógeno associado à colibacilose, doença de manifestação local ou sistêmica, embora nem todos os casos de colibacilose sejam necessariamente causados por cepas APEC (JOHNSON *et al.*, 2022). A colibacilose é considerada a doença bacteriana infecciosa mais comum em frangos e perus de corte, afetando a maioria das espécies aviárias. É considerada uma das doenças mais importantes na produção avícola, pois leva a perdas econômicas significativas, devido à alta morbidade, mortalidade e condenação de carcaça (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NOLAN *et al.*, 2020).

A doença é naturalmente oportunista e a infecção pode ser causada por falhas de manejo, como altas concentrações de amônia, alta densidade populacional, flutuações de temperatura e outras mudanças ambientais que causam estresse nas aves. Também pode estar associada a infecções causadas por vírus respiratórios, como o vírus da doença de Newcastle (NDV), o metapneumovírus aviário (aMPV) e o vírus da bronquite infecciosa (IBV), ou agentes bacterianos como *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synovae* (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; JOHNSON *et al.*, 2022; NOLAN *et al.*, 2020).

Coinfecções são comuns, e nesses casos, mais de um patógeno está envolvido. Nessas situações, as aves podem apresentar sinais clínicos mais graves do que nos casos de infecções causadas por um único agente. Geralmente, a interação entre diferentes patógenos no mesmo local de infecção resulta em uma exacerbação dos sinais clínicos. No entanto, há casos em que

a infecção por um patógeno pode interferir na infecção por um segundo patógeno, atenuando os sinais clínicos (SAIF *et al.*, 2020; SAMY; NAGUIB, 2018).

O IBV é um coronavírus que afeta aves e é responsável pela Bronquite Infecciosa Aviária, uma doença contagiosa e imunossupressora que causa perdas econômicas significativas para os produtores. A presença da *Escherichia coli* como um agente secundário ao IBV é comumente observada e essa infecção secundária afeta gravemente as galinhas, resultando em manifestações de septicemia aguda que frequentemente levam a óbito (MATTHIJS *et al.*, 2009; SMITH; COOK; PARSELL, 1985).

O aMPV é um importante agente envolvido em doenças multifatoriais do trato respiratório superior de perus e galinhas e tais infecções podem estar associadas a outros vírus ou bactérias, que podem agravar as infecções (LEGNARDI *et al.*, 2021). Nas aves, quadros de Síndrome da Cabeça Inchada (SCI) são característicos quando bactérias oportunistas atuam como agentes secundários, sendo *Escherichia coli* a mais comum nesses casos (ARNS; ZUANAZE, 2009; SUAREZ *et al.*, 2020).

Cepas APEC podem ser encontradas na microbiota intestinal de aves saudáveis, portanto permanecem nas criações por um longo período, contaminando alimentos e água, o que pode disseminar a bactéria para outras aves. A via de entrada mais comum da bactéria é através do trato respiratório superior. Após a entrada, ocorre a colonização e multiplicação do agente na traqueia e nos sacos aéreos, seguidos pela infecção do fígado, pericárdio, bacteremia e infecção em outros órgãos. As principais lesões encontradas são: traqueíte, aerossaculite, pericardite e perihepatite (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN *et al.*, 2020). Todavia, a transmissão de *E. coli* patogênica por contaminação fecal da casca do ovo é comum e pode ser responsável por uma alta mortalidade de pintinhos (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN *et al.*, 2020).

2.3 Fatores de virulência

Diferentes fatores de virulência e patogenicidade são utilizados por cepas APEC para causar quadros de colibacilose nas aves. Os principais fatores de virulência descritos incluem proteínas que promovem aderência e invasão, fatores envolvidos na produção de toxinas, sistemas de secreção e resistência a antibióticos (KATHAYAT *et al.*, 2021; NOLAN *et al.*, 2020).

Um conjunto de cinco genes foi identificado e estes genes são considerados preditores de virulência mínima para o isolado ser capaz de causar colibacilose e são usados para

diferenciar APEC de *Escherichia coli* fecal aviária (AFEC). Esses genes são *iutA* (gene do receptor de sideróforo de aerobactina), *iss* (gene de sobrevivência sérica aumentada epissomal), *iroN* (gene do receptor de sideróforo de salmochelina), *hlyF* (hemolisina aviária putativa) e *ompT* (gene de protease de membrana externa epissômica) (FERREIRA; KNÖBL, 2009; JOHNSON *et al.*, 2008; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

2.3.1 Adesinas

A aderência é um fator importante para o estabelecimento da infecção, e as cepas patogênicas de *E. coli* possuem fímbrias e adesinas específicas que permitem a aderência às células do tecido que é o foco da infecção.

Na grande parte das linhagens APEC, tem-se fímbrias do tipo 1, codificadas por um operon de nove genes (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* e *fimH*). Entre as linhagens APEC, as fímbrias do tipo 1 facilitam a adesão às células epiteliais do trato respiratório superior (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NAKAZATO *et al.*, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

As fímbrias P ou F11 (*pyelonephritis associated pil*), codificadas pelo operon *pap* (*papA*, *papE*, *papF*, *papG*, *papH*, *papK* e *papC*) são relacionadas ao estabelecimento da bactéria em órgãos internos e foi descrita pela primeira vez em UPEC como um pilus associado à pielonefrite (NAKAZATO *et al.*, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

As fímbrias Curli, codificadas pelo gene *crl* (*Curli fiber gene*), são apêndices superficiais finos, associadas à ligação bacteriana a proteínas da matriz extracelular e a sobrevivência da bactéria fora do hospedeiro. As fímbrias são codificadas por dois operons, *csgBAC* e *csgDEFG*. A expressão de *csgDEFG* é controlada por fatores ambientais, como temperatura, osmolaridade e pH (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NOLAN *et al.*, 2020).

A hemaglutinina sensível à temperatura (*Tsh*), uma adesina não fimbrial, é uma proteína que atua como adesina e protease e medeia a colonização do trato respiratório do hospedeiro durante a fase inicial da infecção. É responsável pela aglutinação de eritrócitos em temperaturas inferiores a 26 °C (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NOLAN *et al.*, 2020).

2.3.2 Invasinas

As invasinas são associadas à entrada do patógeno nas células hospedeiras. Após a adesão de *E. coli* aos receptores de membrana das células hospedeiras, uma cascata de vias de

transdução de sinal da célula hospedeira é desencadeada, resultando em rearranjos do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, necessários para a invasão bacteriana das células endoteliais (SORA *et al.*, 2021).

Dentre os genes que codificam tais proteínas, tem-se o gene *ibeA* (*invasion of brain endothelium*), *ibeB* (*invasion*), *tia* (*toxigenic invasion locus in ETEC strains*) e *gim B* (*genetic island associated with newborn meningitis*), que já foram relatados em APEC (KATHAYAT *et al.*, 2021).

As invasinas também contribuem para a resistência da APEC ao estresse oxidativo induzido por macrófagos, na formação de biofilme, além da colonização e proliferação no hospedeiro (KATHAYAT *et al.*, 2021).

2.3.3 Resistência aos sistema complemento

A grande maioria das APECs é resistente ao sistema complemento. Tal resistência é conferida por estruturas como LPS, cápsula, ColV colicina e proteínas de membrana externa (NAKAZATO *et al.*, 2009).

Os plasmídeos ColV, variam em tamanho de 80 a 180 kb e são associados com a virulência de *E. coli*, principalmente em APEC. Porém, tal virulência não é associada a capacidade de produção de ColV, mas pelo fato de o plasmídeo possuir uma região que contém uma grande quantidade de genes de virulência conhecidos ou putativos, como genes para motilidade, resistência ao soro, sistemas sideróforos e adesinas (JOHNSON *et al.*, 2006; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

O gene *iss* (*increased serum survival*), localizado no plasmídeo ColV, é encontrado com maior frequência entre cepas patogênicas do que não patogênicas. Acredita-se que seu papel seja prevenir a deposição do complexo de ataque de membrana do sistema complemento (JOHNSON *et al.*, 2006).

Os genes *cvaA*, *cvaB*, *cvaC*, *cvi*, também localizados no plasmídeo ColV, são associados à síntese de colicinas, que são bacteriocinas letais para outras bactérias que não as produzem. Elas são produzidas por algumas cepas de *Escherichia coli* e têm como função matar bactérias concorrentes na mesma ecologia bacteriana (JOHNSON *et al.*, 2006; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; OVI *et al.*, 2023).

As proteínas da membrana externa constroem uma barreira adaptativa eficiente que protege as bactérias contra substâncias deletérias externas. Os genes *ompA* e *ompT* (*Outer membrane protein*) são encontrados no cromossomo de diversas espécies de bactérias Gram-

negativas, incluindo *E. coli*. Ambos codificam uma proteína importante na composição da membrana externa dessas bactérias, com função de adesão e invasão de células hospedeiras, bem como à sua resistência a certas defesas do sistema imunológico. JOHNSON et al. (2022) relataram que a presença do gene *ompT*, em associação com o gene *hlyF* (*putative avian hemolysin*), dois marcadores de plasmídeo APEC, caracteriza um clone APEC de alto risco.

A proteína codificada pelo gene *traT* (*Transfer Protein*), que também pode ser carregado pelo plasmídeo de ColV, aumenta a sobrevivência das células na presença do soro por antagonizar a deposição de C3 e inibir a formação do complexo C5b6 (KATHAYAT et al., 2021).

2.3.4 Sistemas de aquisição de ferro

Após a invasão, o ferro é um micronutriente essencial para o crescimento e proliferação bacteriana dentro do hospedeiro. As APECs são capazes de sobreviver, pois possuem diversos sistemas que permitem a aquisição de ferro por meio de múltiplos sideróforos (tais como aerobactina, salmocolina e yersiniabactina) e transportadores, os quais são responsáveis por sequestrar o ferro dos fluidos corporais. Diversos genes codificantes para sistemas de captação e transporte de ferro já foram descritos em APEC, dentre eles *iucCD*, *iutA*, *aerJ* (*aerobactin*), *iroBCDEN* (*salmochelin*), *fyuA* (*yersiniabactin*), *sitABCD*, *mntH* (*iron and manganese transporter*), *irp2* (*iron repressible protein*), *feoB* (*ferrous ion transporter*), *fepC* (*ferric enterobactin transporter*), *ireA* (*iron-regulated virulence gene*), *eitABCD* (*putative iron transporter*), *chuA* (*outer membrane hemin receptor*) e *bfr* (*bacterioferritin*) (KATHAYAT et al., 2021; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; LING et al., 2013; NOLAN et al., 2020).

Dentre os sideróforos, o sistema aerobactina é codificado pelo operon composto pelos genes *iucABC* e *iut*, tais genes podem ser plasmidiais ou cromossômicos, porém na maioria dos isolados clínicos é cromossômico (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

Os sistemas de aquisição e transporte de ferro transportados no plasmídeo ColV compreendem o sistema de sideróforos como o gene *iroBCDEN* (*catecholate siderophore salmochelin receptor*). O gene *sitABCD* (sistemas de transporte de ferro), assim como os genes *fyuA* (absorção de yersiniabactina férrica) e *irp2* (proteína repressível de ferro), também estão envolvidos na captação de ferro do hospedeiro e foram encontrados em isolados de casos de colibacilose (DZIVA; STEVENS, 2008; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

2.3.5 Toxinas

Diferente da *E. coli* patogênica para mamíferos, as APECs tendem a ser menos toxigênicas (NOLAN *et al.*, 2020). Porém, isolados podem ser capazes de produzir toxinas, dentre elas a toxina codificada pelo gene *vat* (*vacuolating autotransporter toxin*), a qual induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em um efeito citotóxico (KATHAYAT *et al.*, 2021; PARREIRA; GYLES, 2003).

As hemolisinas de *E. coli* podem ser citotóxicas para muitos tipos diferentes de células hospedeiras e para muitos hospedeiros, tanto animais como humanos. Assim ocorre a formação de poros na membrana dos eritrócitos, devido à perda de íons K⁺ intracelulares e o influxo de cátions e água ocorre a lise osmótica. No início há uma lise parcial das células que desencadeia a ativação do receptor purinérgico e cria um poro de panexina mediado pelo hospedeiro, levando à lise completa dos eritrócitos (SORA *et al.*, 2021). As hemolisinas são codificadas pelos genes *hlyF*, *hlyA*, *hlyE* (*putative avian hemolysin*). O gene *hlyF* é encontrado nos plasmídeos ColV e ColBM, e ocorre com elevada frequência em cepas APEC altamente patogênicas (KATHAYAT *et al.*, 2021).

O gene *astA* codifica a proteína EAST1 (*heat-stable enterotoxin*), que apresenta alta similaridade com a toxina estável ao calor de ETEC. Enquanto, o gene *sat* (*secreted autotransporter toxin*) possui atividade de serino-protease (KATHAYAT *et al.*, 2021).

2.3.6 Outros fatores de virulência

Os genes *icmF*, *upaB*, *ibeA*, *epcA*, *waaL*, *ychO* e *yfcO* foram relacionados à capacidade de contribuir para a formação de biofilme em APEC (NOLAN *et al.*, 2020).

Fatores como ilhas genômicas, ilhas de patogenicidade e genes associados à virulência encontrados em elementos genéticos móveis já foram descritos em linhagens APEC (KATHAYAT *et al.*, 2021).

2.4 Colibacilose

A colibacilose aviária abrange todas as infecções em aves, tanto localizadas quanto sistêmicas. Geralmente é mais comum em galinhas, perus e patos, enquanto em outras espécies de aves, como gansos, pássaros domésticos e aves silvestres, é menos frequente. Dentre as formas localizadas da doença têm-se quadros como aerossaculite, celulite, coligranuloma,

colisepticemia, ooforite, onfalite, osteomielite, panoftalmia, pericardite, pleuropneumonia, peritonite, pneumonia, salpingite, síndrome de cabeça inchada (SCI) e sinovite (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN *et al.*, 2020).

2.4.1 Formas localizadas de colibacilose

As taxas de mortalidade por *E. coli* tendem a ser mais altas nos primeiros dias de vida. A onfalite, uma infecção do saco da gema, é comum em pintinhos na primeira semana de vida. As aves tendem a apresentar sinais de inflamação (inchaço, edema e vermelhidão) podendo haver a presença de pequenos abscessos, que caracterizam inflamação aguda do umbigo. O abdômen tende a estar distendido e os vasos sanguíneos podem apresentar-se hiperêmicos. Aves que vivem mais de 4 dias também podem desenvolver peritonite, pericardite ou peri-hepatite, indicando disseminação local e sistêmica do organismo a partir do saco vitelino. Os animais que sobrevivem à infecção se tornam uma fonte de disseminação para os demais animais (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN *et al.*, 2020).

Em aves adultas, pode ocorrer septicemia devido a infecção por APEC. As lesões podem estar ausentes ou incluir pericardite, peritonite e coloração biliar e focos necróticos no fígado. Em aves poedeiras, cepas APEC podem atingir o oviduto através do saco aéreo abdominal esquerdo, levando a salpingite e perda da postura de ovos. Alternativamente, APECs podem invadir a cavidade peritoneal através do oviduto, levando à peritonite e morte (FERREIRA; KNÖBL, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

A celulite em frangos foi relatada pela primeira vez em 1984 na Inglaterra. Celulite é a inflamação aguda do tecido subcutâneo, caracterizada pela presença de lesões contendo exsudato serossanguinolento a caseoso, com aspecto fibrinoheterofílico, nos tecidos subcutâneos. Essas lesões, muitas vezes referidas como "placas", são encontradas na pele sobre o abdômen ou entre a coxa e a linha média. Em alguns casos, podem ocorrer outras lesões colibacilares ou uma redução na produtividade (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; FERREIRA; KNÖBL, 2009; NOLAN *et al.*, 2020). Por não causar sinais clínicos ou mortalidade, a lesão é geralmente descoberta no momento do abate. Segundo artigo técnico divulgado pela revista *Avicultura Industrial*, as perdas econômicas devido às condenações de carcaça por celulite nos abatedouros ultrapassam os 10 milhões de dólares (BONATTO *et al.*, 2022).

Fatores como a linhagem da ave, sexo, densidade de aves no lote e tipo de cama, são fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento de celulite. Diferentes microrganismos

podem estar envolvidos nos casos de celulite, porém *Escherichia coli* é o organismo mais frequentemente isolado nas lesões. As cepas envolvidas em casos de celulite pertencem aos mesmos sorogrupos das envolvidas em outras formas de colibacilose. Esses isolados geralmente produzem colicina e aerobactina, e há a presença de invasinas, dentre eles os genes *ibeA* e *gimB*, bem como a cápsula do grupo II *KpsMTII*, que aumenta a capacidade das cepas em causar celulite (NOLAN *et al.*, 2020).

Descrita pela primeira vez em frangos de corte na África do Sul, a SCI é uma celulite aguda ou subaguda envolvendo os tecidos periorbital e subcutâneo adjacente da cabeça (NOLAN *et al.*, 2020; PAIVA *et al.*, 2015). A presença do inchaço da cabeça é associada ao exsudato inflamatório sob a pele que se acumula devido à infecção bacteriana, majoritariamente *E. coli*, após infecções virais do trato respiratório superior, geralmente causadas por aMPV e IBV (NOLAN *et al.*, 2020).

Os fatores de virulência de isolados envolvidos em casos de SCI geralmente são os mesmos envolvidos em quadros de colissepticemia, e incluem adesinas fimbriais, produção de colicina, aerobactina e resistência ao sistema complemento (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN *et al.*, 2020).

Aves jovens (com idade entre quatro e nove semanas) são mais susceptíveis aos quadros respiratórios, forma mais comum de colissepticemia. A infecção do trato respiratório com APEC resulta em depressão, febre e morte. As lesões respiratórias incluem aerossaculite com um exsudato seroso a fibrinoso, uma infiltração inicial com heterófilos e um subsequente predomínio de fagócitos mononucleares. Nas infecções mais generalizadas, observam-se também lesões de pericardite e peri-hepatite (FERREIRA; KNÖBL, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

2.4.2 Formas sistêmicas de colibacilose

Quando presente na corrente sanguínea e, conseqüentemente, de forma sistêmica, a infecção denomina-se colissepticemia. A colissepticemia progride por estágios que incluem septicemia aguda, poliserosite subaguda e inflamação granulomatosa crônica (NOLAN *et al.*, 2020).

Dentre as lesões, durante a necropsia, tecidos podem adquirir uma coloração verde após exposição ao ar, a Bursa de Fabricius pode encontrar-se atrofiada ou inflamada e as aves podem apresentar pericardite (inflamação da membrana serosa que envolve o coração), a qual pode estar associada à miocardite (FERREIRA; KNÖBL, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

A manifestação da doença depende de variáveis como a gravidade e duração da doença, padrão das lesões, virulência da cepa envolvida e como o sistema hospedeiro reage à infecção (NOLAN *et al.*, 2020).

Em frangos e perus, a colisepticemia de origem respiratória é a forma mais comum de colisepticemia. Nesses casos, a bactéria atinge a corrente sanguínea após danos na mucosa respiratória causados por agentes infecciosos ou não infecciosos e a mortalidade ocorre nos primeiros 5 dias. Dentre os agentes mais comuns, tem-se o IBV, o vírus da doença de Newcastle (NDV), aMPV, micoplasmoses e amônia. As lesões concentram-se no trato respiratório superior, os sacos aéreos apresentam espessamento e frequentemente apresentam exsudato caseoso na superfície respiratória (FERREIRA; KNÖBL, 2009; NOLAN *et al.*, 2020).

Quando não há mortalidade, após a infecção as aves podem desenvolver sequelas em áreas mais vulneráveis como cérebro, olhos, tecidos sinoviais e ossos. Dentre as complicações pós-infecção tem-se a pericardite constrictiva, fibrose do fígado, ascite (acúmulo de líquido na cavidade abdominal), meningite e meningoencefalite (inflamação das membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal), panoftalmite (inflamação generalizada dos tecidos oculares) e osteoartrite e sinovite (inflamação da articulação, do tecido ósseo e dos tecidos sinoviais) (NOLAN *et al.*, 2020).

2.5 Resistência a antimicrobianos

2.5.1 Antimicrobianos e o processo de resistência

Agentes antimicrobianos são substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas, que atuam inibindo ou matando microrganismos e são utilizados no tratamento de diversos tipos de infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas (OIE, 2021).

A busca por novos compostos bioativos tornou-se um foco crucial para a sociedade moderna. Uma das abordagens para identificar esses compostos é o estudo e análise de microrganismos. Em 1880, Pasteur observou uma relação antagônica entre fungos e bactérias. Frederick William Twort e Felix d'Hérelle fizeram descobertas independentes de bacteriófagos em 1915 e 1917, respectivamente. Desde o início da década de 1920 até o final da década de 1930, o uso de bacteriófagos para tratar doenças infecciosas aumentou em todo o mundo. Mais tarde, em 1923, Selman Waksman descobriu uma atividade inibitória entre bactérias e protozoários no solo (ASWANI; SHUKLA, 2021; BRUNEL, 1951; FLEMING, 1929).

Essas observações foram fundamentais para lançar as bases para a descoberta de novos antibióticos. Talvez o exemplo mais conhecido disso seja a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Essa descoberta levou ao uso generalizado de antibióticos e revolucionou a medicina moderna. Nos anos seguintes, os pesquisadores continuaram a busca por novas fontes de compostos bioativos, incluindo aqueles derivados de microrganismos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

A Era de Ouro da descoberta de antibióticos foi marcada por uma rápida sucessão de novas descobertas e pelo desenvolvimento de muitos antibióticos diferentes. No entanto, o uso excessivo dessas drogas levou ao surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, criando novos desafios para a medicina moderna (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Na avicultura, os antimicrobianos mais utilizados são os betalactâmicos (penicilinas, amoxicilina, ampicilina e ceftiofur), polipeptídeos (bacitracina), aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina e neomicina), aminociclítóis (espectinomicina), macrolídeos (eritromicina, tilosina e tilmicosina) e lincosamidas (lincomicina), florfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas (ácido nalidíxico e enrofloxacina) e ionóforos (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

É comum o uso de antibióticos como agentes profiláticos, metafiláticos e promotores de crescimento (SCHWARZ; KEHRENBERG; WALSH, 2001). Entretanto, o uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção pecuária tem estado sob escrutínio nos últimos anos. Enquanto os primeiros estudos em meados do século XX demonstraram que esse uso era benéfico, surgiram preocupações sobre o seu potencial impacto na resistência a antibióticos em populações animais e humanas (CALLAWAY *et al.*, 2003; GAMBI *et al.*, 2022; IBRAHIM *et al.*, 2019a; ROTH *et al.*, 2019).

Para lidar com essas preocupações, muitos países implementaram regulamentações sobre o uso de antibióticos na produção animal. Alguns países proibiram totalmente o uso de antibióticos como promotores de crescimento, enquanto outros impuseram restrições ao seu uso (EFSA; ECDC, 2022).

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana é um processo complexo. A resistência pode ser classificada como natural ou adquirida. A resistência natural pode ser intrínseca e induzida. A resistência intrínseca é aquela que está sempre presente na espécie bacteriana, independentemente da exposição prévia a antibióticos. Já a resistência induzida ocorre quando os genes relacionados à resistência estão naturalmente presentes na bactéria, mas só são expressos em níveis de resistência após a exposição a um antibiótico (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; REYGAERT, 2018).

A resistência adquirida, por outro lado, é o resultado de alterações genéticas em bactérias, como mutações ou transferência de genes de resistência de outras bactérias (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017; TORRES-BARCELÓ, 2018). Essa transferência pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a transferência horizontal de genes (HGT), que envolve a transferência de material genético entre diferentes células bacterianas. Existem três mecanismos clássicos de HGT: conjugação (transferência por contato direto, como a transferência de plasmídeos e outros elementos conjugativos por meio de um pilus conjugativo), transformação (captação de DNA do ambiente) e transdução (dependente de bacteriófagos), que permitem a transferência de material genético. Além dos mecanismos clássicos, o DNA tem outras rotas de transferência entre bactérias, por exemplo por meio de vesículas de membrana (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022; COLLETT *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2019a; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; REYGAERT, 2018).

2.5.2 Desinfetantes

A emergência da resistência a antimicrobianos e bactérias multirresistentes levanta a necessidade de identificar alternativas que possam substituir o seu uso. Dentre essas alternativas, os desinfetantes têm se destacado como uma das opções mais eficazes e amplamente utilizadas (MC CARLIE; BOUCHER; BRAGG, 2020).

O processo de desinfecção compreende a aplicação de métodos físicos ou químicos para eliminar microrganismos, especialmente aqueles com potencial patogênico presentes em superfícies de objetos ou no ambiente. No entanto, devido à sua praticidade, a utilização de agentes químicos tem sido amplamente adotada. Diferentes tipos de agentes químicos podem ser empregados na desinfecção, incluindo ácidos, álcalis, alcoóis, aldeídos, halogênios, fenóis e compostos quaternários de amônia. A seleção desses agentes baseia-se em seu espectro de atividade, eficácia e capacidade de inativação pela matéria orgânica (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016).

Os desinfetantes representam uma alternativa viável para o controle do crescimento de microrganismos em diversas áreas, tais como indústria alimentícia, agroindústria, estabelecimentos de saúde, residências e na fabricação de produtos farmacêuticos (MC CARLIE; BOUCHER; BRAGG, 2020; TONG *et al.*, 2021). Na indústria avícola, por exemplo, alguns dos principais desinfetantes utilizados incluem o formaldeído, compostos de amônio quaternário (QACs), peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio (BERMUDEZ; STEWART-BROWN, 2003; JAENISCH; KUCHIISHI; COLDEBELLA, 2010).

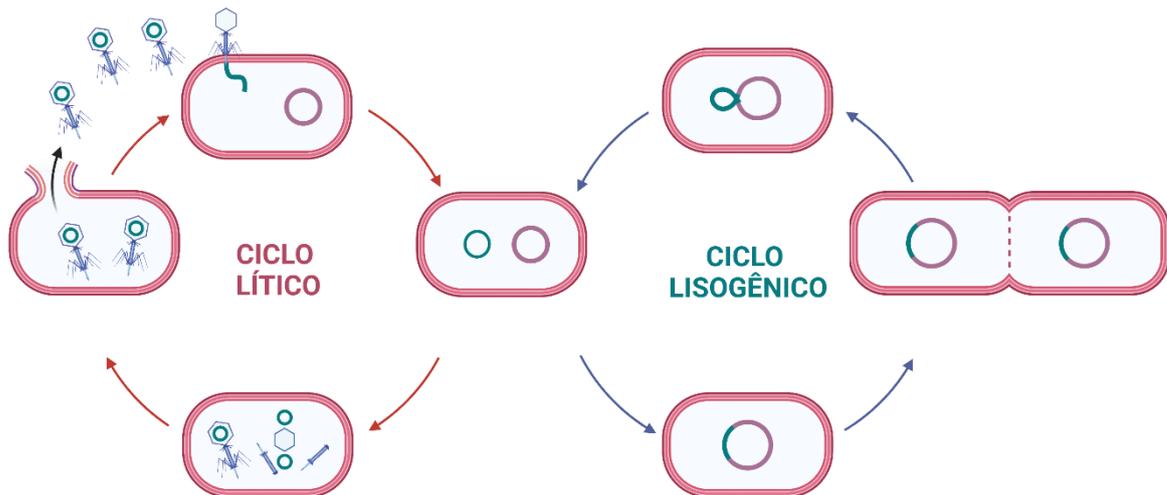
Assim como a resistência a antimicrobianos, a resistência aos agentes desinfetantes pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A tolerância intrínseca é uma propriedade natural controlada cromossomicamente, o que significa que certas espécies bacterianas são menos suscetíveis a determinados desinfetantes em comparação a outras espécies. Já a resistência adquirida é observada em certas cepas de bactérias que são menos suscetíveis a certos antimicrobianos em comparação com a média da espécie bacteriana, e isso pode ocorrer devido a alterações genéticas celulares ou à aquisição de elementos genéticos móveis exógenos contendo genes de resistência (CHEN *et al.*, 2021; MC CARLIE; BOUCHER; BRAGG, 2020).

2.5.3 Transferência horizontal de genes mediada por bacteriófagos

Bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são vírus que infectam e se replicam dentro de bactérias. Eles são as entidades biológicas mais abundantes na Terra e desempenham um papel crucial na formação de comunidades microbianas e na evolução das populações bacterianas. No entanto, estudos recentes destacaram o potencial dos fagos para transferir e propagar genes de resistência a antibióticos, um fenômeno que pode ter consequências significativas para a saúde humana (CLOKIE *et al.*, 2011; SIMMONDS; AIEWSAKUN, 2018).

Os fagos podem infectar bactérias como fagos líticos ou como fagos lisogênicos (Figura 1). Os fagos líticos se replicam dentro da célula hospedeira, levando à sua destruição e liberação de fagos descendentes. Em contraste, os fagos lisogênicos integram seu DNA no genoma do hospedeiro e podem permanecer inativos por longos períodos sem causar lise. Durante esse tempo, eles podem se replicar junto com o cromossomo hospedeiro e serem transmitidos verticalmente para as células-filhas (HARADA *et al.*, 2018; HOBBS; ABEDON, 2016).

Figura 1 – Ciclos de Infecção dos Fagos: No ciclo lítico, a lise da célula hospedeira é a única maneira de liberar as novas partículas virais. Já no ciclo lisogênico, o ácido nucleico do fago recombina-se com o ácido nucleico da bactéria, resultando na formação de um profago. Este profago se replica com o cromossomo hospedeiro e é transferido verticalmente da célula inicialmente infectada para suas células filhas durante a divisão celular.



Fonte: elaborado pela autora

Embora os bacteriófagos tenham sido explorados como potenciais agentes de biocontrole contra infecções bacterianas, estudos recentes levantaram preocupações sobre seu impacto não intencional nas populações bacterianas. Uma dessas preocupações é o potencial dos fagos para transferir inadvertidamente material genético, incluindo genes de resistência a antibióticos, entre bactérias (ELOIS *et al.*, 2023; ROGOVSKI *et al.*, 2021; SCHNEIDER, 2021).

Estudos demonstram que os fagos lisogênicos carregam genes que codificam a resistência a antibióticos e os transferem para bactérias suscetíveis por meio de um processo chamado conversão lisogênica. Esse processo ocorre quando um fago lisogênico integra seu DNA ao cromossomo hospedeiro, carregando consigo um gene de resistência a antibióticos. O gene de resistência pode então ser expresso pela bactéria hospedeira e transferido horizontalmente para outras bactérias por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposons (BRÜSSOW; CANCHAYA; HARDT, 2004; CANCHAYA *et al.*, 2003; HOBBS; ABEDON, 2016).

2.6 Biofilmes

Em 1683, Antoni van Leeuwenhoek descreveu a presença de biofilmes na matéria de seus próprios dentes (HØIBY, 2017). Porém, foi a partir de 1970 que estudos foram desenvolvidos visando entender a sua formação (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As bactérias podem viver de duas formas diferentes, no estado planctônico (flutuação livre) ou no estado sésil (aderido a uma superfície). Quando no estado sésil, podem resistir ao ataque imunológico do hospedeiro e mostram-se mais resistentes aos antibióticos quando comparadas com seu estado planctônico (KHATOON *et al.*, 2018; LANDINI *et al.*, 2010; RUAN *et al.*, 2021; SAUER *et al.*, 2022).

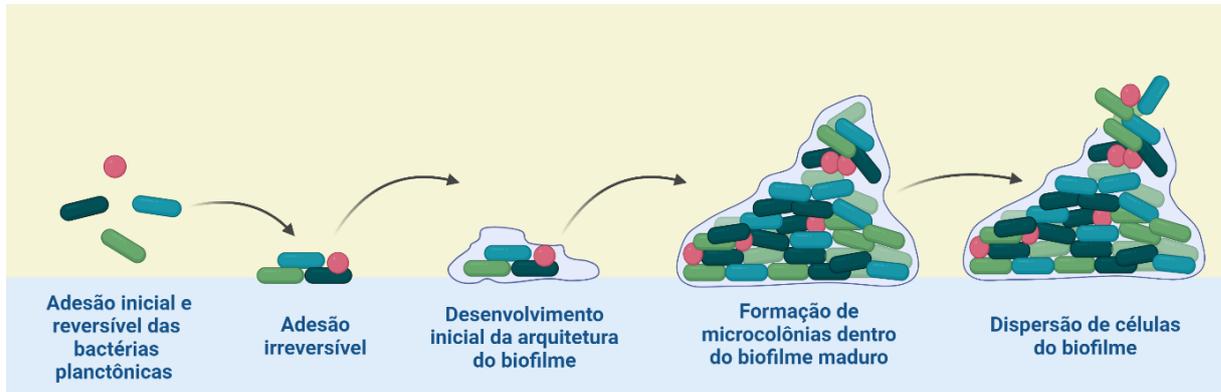
O biofilme, termo atribuído por Bill Costerton em 1978, é um agregado de microrganismos de uma única espécie ou de diferentes espécies e gêneros bacterianos, envolvidos por uma matriz extracelular polimérica, que se desenvolvem e fixam-se em superfícies inertes ou orgânicas (BERLANGA; GUERRERO, 2016; DONLAN, 2002). A maioria das bactérias em ecossistemas naturais e em infecções crônicas crescem em formato de biofilme. Além da capacidade de adquirir elementos genéticos transmissíveis, as bactérias que vivem em biofilmes também apresentam maior resistência à limpeza e saneamento (SKYBERG *et al.*, 2007).

A transição das células planctônicas para o biofilme é regulada por uma variedade de sinais ambientais e fisiológicos, como densidade celular bacteriana, disponibilidade de nutrientes e estresse celular. Organismos unicelulares unem-se formando uma comunidade que está ligada a uma superfície sólida e coberta por uma matriz de exopolissacarídeos (SATPATHY *et al.*, 2016).

O processo de formação do biofilme (Figura 2) envolve cinco estágios: (I) aderência inicial e reversível das bactérias planctônicas a superfícies. Diversos fatores físicos e químicos influenciam esta etapa, como a natureza da superfície, a disponibilidade de nutrientes e a presença de outras células bacterianas. Durante essa etapa, os microrganismos se aderem à superfície por meio de interações químicas e físicas, como a formação de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals; (II) transição da aderência reversível para a irreversível, mediada por adesinas e/ou por produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pela bactéria; (III) as células adsorvidas à superfície se multiplicam e ocorre desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, a matriz extracelular produzida pelos microrganismos começa a se tornar mais complexa e a se acumular; (IV) as bactérias começam a se agrupar e formar microcolônias dentro do biofilme maduro e; (V) dispersão de células do biofilme para o

ambiente ao redor, com retorno ao estado planctônico e possibilidade de colonização de novo ambiente (STOODLEY *et al.*, 2002).

Figura 2– Processo de formação do biofilme.



Fonte: elaborado pela autora

Diversos estudos investigam a composição de biofilmes que se formam na superfície de equipamentos utilizados em diferentes indústrias alimentícias (KUMAR; ANAND, 1998; SHI; ZHU, 2009). No setor da indústria e produção animal, a formação de biofilmes pode resultar em problemas como incrustações e contaminação de bebedouros, bem como na cadeia de produção de alimentos, devido ao risco de contaminação cruzada, representando uma ameaça à saúde do consumidor. Além disso, os biofilmes podem servir como reservatórios de resistência aos antimicrobianos, uma vez que a matriz protetora favorece a transferência horizontal de genes (BERLANGA; GUERRERO, 2016; NEWMAN *et al.*, 2021).

Alguns genes (*icmF*, *upaB*, *ibeA*, *epcA*, *waaL*, *yhcO* e *yfc*) associados à capacidade de formação de biofilme já foram identificados em APEC, porém os mecanismos exatos de formação desses biofilmes ainda não foram completamente elucidados (NOLAN *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) em frangos de corte do plantel brasileiro e caracterizar APEC oriunda de fêmures dos frangos.

3.2 Objetivos específicos

I. Isolar e determinar a prevalência de *Escherichia coli* em frangos de corte da produção brasileira;

II. Caracterizar molecularmente *Escherichia coli* oriundas dos fêmures dos frangos de corte da produção brasileira;

III. Avaliar a capacidade de produção de biofilme dos isolados de *Escherichia coli*;

IV. Avaliar o perfil fenotípico de resistência dos isolados de *Escherichia coli* frente à diferentes classes de antimicrobianos;

V. Determinar por meio de sequenciamento genoma completo a espécie dos isolados, o sorogrupo dos isolados, presença de genes de virulência e presença de genes de resistência a antimicrobianos, incluindo genes relacionados a bacteriófagos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

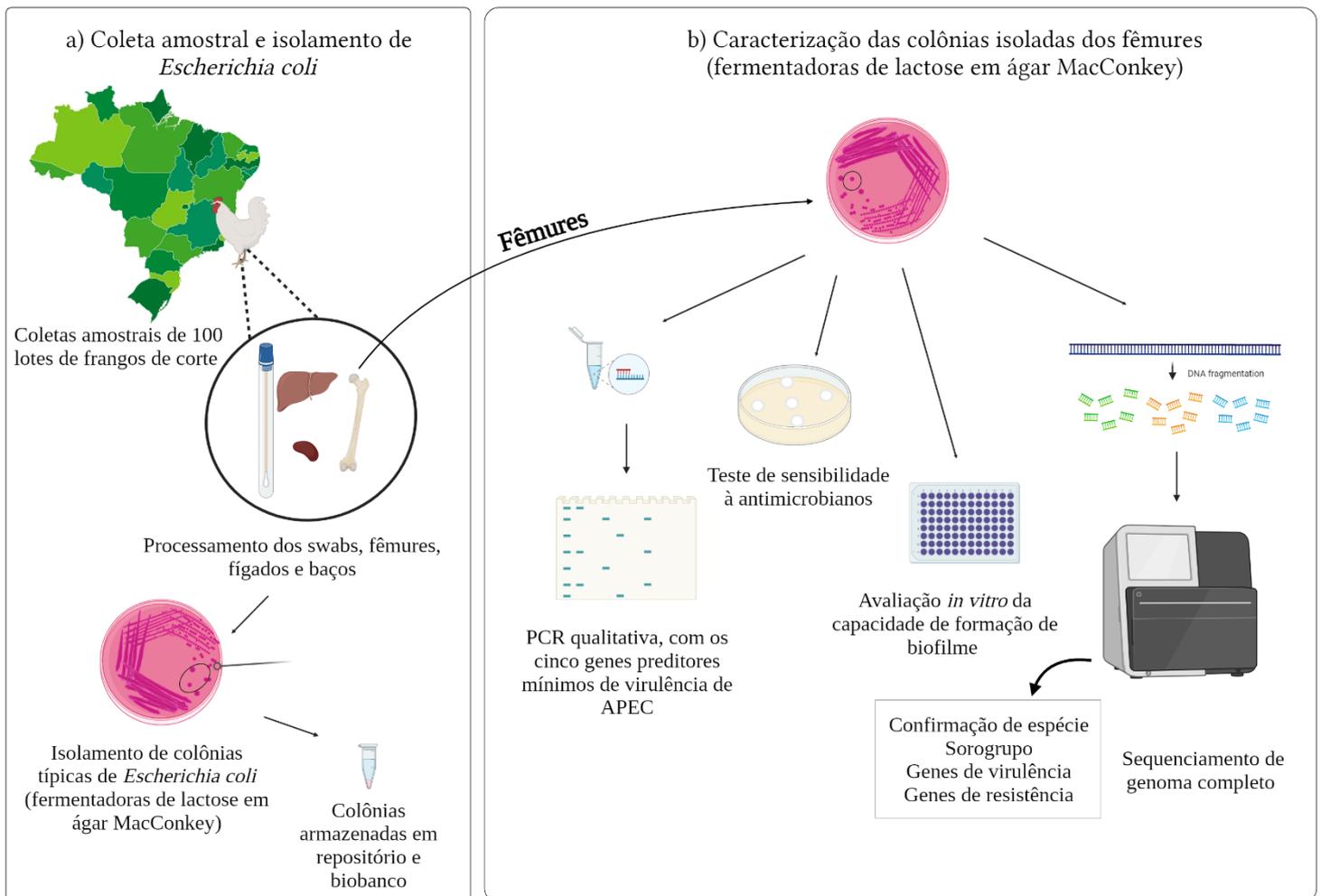
Todas as amostras foram obtidas a partir do projeto “*Rastreabilidade e caracterização de patógenos entéricos e respiratórios na avicultura brasileira com foco em Saúde Única*” (Termo de convênio UFSC: 23080.051764/2020-78). Carcaças de aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) necropsiadas a campo para inspeção de rotina foram cedidas para o presente estudo por granjas produtoras de aves no Brasil. Um total de 100 lotes foram avaliados no Brasil, sendo as coletas realizadas entre os meses de agosto e novembro de 2021. As amostras foram provenientes dos estados do Paraná (n=30), Santa Catarina (n=15), Rio Grande do Sul (n=15), São Paulo (n=10), Minas Gerais (n=10) e Ceará (n=20). Os estados que participaram do estudo representam aproximadamente 80% da produção de carne de frango no Brasil (ABPA, 2023).

Os lotes foram selecionados com base no histórico de problemas respiratórios e as aves necropsiadas tinham entre 13 e 32 dias de idade. Além do histórico, alguns dos lotes apresentavam sinais clínicos respiratórios como espirros, ronqueira e corrimento nasal. No momento da coleta realizou-se a anamnese de todos os lotes, junto da avaliação clínica do lote.

Para cada lote coletou-se dez *swabs* nasotraqueais, três fígados, três baços e três fêmures. De imediato, logo após as coletas, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram recepcionadas e processadas.

A Figura 3 apresenta o desenho experimental do estudo, compondo o fluxograma de atividades.

Figura 3– Desenho experimental das atividades do presente estudo, considerando: (a) Coleta amostral, isolamento de colônias características de *Escherichia coli* (fermentadoras de lactose em ágar MacConkey) de *swabs* nasotraqueais, fígado, baço e fêmures e armazenamento dos isolados em biobanco; b) Caracterização dos isolados de fêmures por PCR qualitativa para identificação e confirmação de APEC, teste de sensibilidade a antimicrobianos, avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* e sequenciamento de genoma completo.



Fonte: elaborado pela autora

Para o processamento, os *swabs* nasotraqueais foram suspensos em PBS 1x (cloreto de sódio (NaCl) - 137 mM; cloreto de potássio (KCl) - 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) - 10 mM; fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) - 1,8 mM). Os fêmures foram processados em cabine de segurança biológica de forma asséptica, realizou-se o corte da cabeça do fêmur e a coleta da medula óssea com *swab*, que foi suspenso em PBS 1x. Fígados e baços foram individualmente lavados com PBS 1x, pesou-se 2g de cada órgão e este volume do

material foi macerado/picoteado. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C na sala de criopreservação do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

4.2 Isolamento de *Escherichia coli*

Para o isolamento de *E. coli*, os *swabs* nasotraqueais, *swabs* dos fêmures, fígados e baços foram inoculados em placas de ágar MacConkey (KASVI, Espanha), e incubados a 37 °C por 24 horas. Colônias típicas de *E. coli* (colônias rosadas, precipitadas) foram isoladas, repicadas e armazenadas em repositório e biobanco, em caldo Luria Bertani (LB) (KASVI, Espanha) com glicerol (5:1), e mantidos a -80 °C para posterior extração do DNA genômico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

4.3 Identificação de *E. coli* por MALDI-TOF

Os isolados característicos de *E. coli* em ágar MacConkey, provenientes de *swab* nasotraqueal, fígado e baço foram enviados ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ) para a realização da técnica *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight* (MALDI TOF) *Mass Spectrometry* (MS), para a identificação das espécies. Esta técnica caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa, e pode ser utilizada para a pesquisa e identificação de proteínas e peptídeos ou na identificação taxonômica de microrganismos, por exemplo (DAVIES *et al.*, 2022; SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013; SENG *et al.*, 2009).

A preparação da amostra para análise utilizando MALDI-TOF-MS envolve a mistura de proteínas ou peptídeos com uma matriz de absorção de luz, geralmente um composto orgânico, depositado em um alvo de metal e submetido ao vácuo para remover o ar. Um laser é utilizado para ionizar as moléculas da amostra, gerando íons carregados positivamente, os quais são acelerados por um campo elétrico e separados conforme a sua relação m/z em um espectrômetro de tempo de voo (TOF). A detecção dos íons gerados é realizada por meio de um detector que gera um espectro de massa que pode ser usado para identificar as proteínas e peptídeos presentes na amostra por comparação com bancos de dados de espectros de massa previamente identificados (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013).

Utilizou-se o equipamento Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha). As amostras foram preparadas por transferência direta estendida da seguinte forma: colônias bacterianas foram colhidas e depositadas (em duplicata) nos alvos de uma placa de aço

polido, sendo aplicado 1µl de ácido fórmico a 70% (v/v), e após a secagem, 1µl da solução matriz (HCCA alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). Para obtenção dos dados, foram realizados dois experimentos independentes para cada amostra. Além disso, foi utilizada a cepa DH5α de *Escherichia coli* como padrão para calibração e espectro de referência do equipamento. O processamento dos espectros das proteínas entre 2 e 20 kDa foi obtido através do software flexControl versão 3.4 (Bruker Daltonics, EUA) e comparado com os espectros presentes no pacote MBT 7854 MSP Library do software MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics). Os parâmetros utilizados para interpretação dos resultados da identificação por meio de MALDI-TOF foram os seguintes: a) A identificação da espécie foi considerada como altamente provável quando a pontuação foi de 3.000 a 2.300; b) A identificação em nível de gênero foi considerada segura e de espécie considerada provável quando a pontuação foi de 2.299 a 2.000; c) A identificação apenas em nível de gênero foi considerada provável quando a pontuação foi de 1.999 a 1.700; d) A identificação foi classificada como não confiável quando a pontuação foi ≤ 1.699 .

4.4 Identificação e confirmação de APEC

Para a realização da reação de PCR qualitativa, antibiogramas, teste de biofilme e sequenciamento completo, optou-se em utilizar os fêmures, pois estes foram encaminhados íntegros ao LVA, minimizando, assim, as possibilidades de contaminação da medula óssea. Ademais, há uma elevada probabilidade de que os isolados sejam altamente patogênicos, por estarem circulando em fêmur.

A extração de DNA genômico foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio adaptado (WILSON, 2001). Foi realizado crescimento das colônias criopreservadas em caldo LB por 6 horas a 37 °C, em seguida foi realizado o cultivo em ágar MacConkey, e incubou-se por 24 horas a 37 °C. Uma colônia foi selecionada e inoculada, novamente, em 25 mL de caldo LB por 18 horas. Após a incubação, foi realizada a centrifugação (700 ×g x 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (sedimento) foi lavado 2 vezes em PBS 1x pH 7,2. Foi realizada nova centrifugação, separando o *pellet* em um microtubo. Para a lise da amostra, o *pellet* foi suspenso em 200 µL de tampão de lise (10mM Tris HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 25mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 8, 1% dodecil sulfato de sódio (SDS)), adicionou-se 26,2 µL de Proteinase K e incubado em termobloco a 56 °C por 30 minutos. Para a extração do DNA, adicionou-se igual volume de fenol equilibrado, foi homogeneizado por inversão, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 ×g a temperatura ambiente. A fase aquosa foi

transferida para um novo microtubo e adicionou-se o mesmo volume de uma solução Fenol-Clorofórmio (1:1), foi homogeneizado por inversão, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 ×g a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se igual volume de clorofórmio, foi homogeneizado por inversão e centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 ×g a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, adicionou-se a cada tubo 2,5x o volume total de etanol 100% gelado. Os microtubos foram mantidos a -20 °C por 1 hora. Em seguida, foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 ×g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% gelado, e centrifugado por 10 minutos a 14.000 ×g a 4 °C. O *pellet* foi seco em termobloco à 37 °C. Por fim, o *pellet* foi suspenso em 50 µL de água DNase-, RNase-free. O DNA foi quantificado por meio de densidade óptica em espectrofotometria pelo aparelho NanoVue™ e armazenado à -20 °C.

Conforme descrito por Johnson et al. (2008), para a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), os genes (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*) foram utilizados como os preditores de virulência mínima de APEC (Tabela 1). Os reagentes para a amplificação dos cinco alvos gênicos foram utilizados nas seguintes concentrações: cloreto de magnésio 2 mM, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) 0,25 mM, 0,3 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA), tampão 1x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, EUA), 3 µL de amostra e água ultrapura estéril para completar 25 µL. As reações foram realizadas em termociclador (TECHNE Flexigene), utilizando os seguintes parâmetros de ciclagem: 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos, 68 °C por 3 minutos; e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos (JOHNSON *et al.*, 2008). Como controle positivo utilizou-se uma cepa APEC, positiva para os cinco genes, gentilmente fornecida pelo Dr. Jorge Augusto Petroli Marchesi do MercoLab Laboratórios LTDA.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel horizontal de agarose a 1%, utilizado *GelRed* como agente intercalante de DNA. Os tamanhos dos amplicons foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular *low molecular weight* (LMW).

Tabela 1 – Gene alvo, sequência dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e referência bibliográfica.

Gene alvo	Sequência do iniciador	Tamanho do amplicon	Referência
<i>iroN</i>	F 5'-AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCCG -3' R 5'-GATCGCCGACATTAAGACGCAG -3'	667 pb	(RODRIGUEZ-SIEK <i>et al.</i> , 2005)
<i>ompT</i>	F 5'- TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT -3' R 5'- TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC -3'	496 pb	(JOHNSON <i>et al.</i> , 2008)
<i>hlyF</i>	F 5'- GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC -3' R 5'- GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG -3'	450 pb	(JOHNSON <i>et al.</i> , 2008)
<i>iss</i>	F 5'- CAGCAACCCGAACCACTTGATG -3' R 5'- AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA -3'	323 pb	(RODRIGUEZ-SIEK <i>et al.</i> , 2005)
<i>iutA</i>	F 5'- GGCTGGACATCATGGGAAGTGG -3' R 5'- CGTCGGGAACGGGTAGAATCG -3'	302 pb	(JOHNSON <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: elaborado pela autora

4.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de fêmures

O procedimento foi adaptado a partir de trabalhos anteriores que avaliaram a formação de biofilmes (NIELSEN *et al.*, 2018; SKYBERG *et al.*, 2007). Foi realizado o cultivo dos isolados em ágar MacConkey, e incubou-se por 24 horas a 37 °C. Três colônias foram selecionadas e inoculadas em 2 mL de caldo LB e incubadas por 16 horas a 37 °C. Em seguida, 2 µL de inóculo foram adicionados a 198 µL de caldo LB em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Foram utilizados três poços por isolado, três poços como controle positivo, utilizando a cepa de *E. coli* ATCC 25922, e três poços como controle negativo (sem crescimento), contendo apenas o caldo não inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas sem agitação. Após 24 horas de crescimento, realizou-se a leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Thermo Scientific® Multiskan GO) a 600nm. Em seguida, o caldo foi descartado e os poços foram lavados suavemente três vezes com água. Após a secagem, adicionou-se 200µL de metanol por poço, e incubou-se por 20 minutos. Após a lavagem com água, as placas foram coradas por 10 minutos com 200 µL de solução de cristal violeta 0,1%. Após a coloração, as placas foram lavadas três vezes com água e secas ao ar por uma hora. Por fim, a ressolubilização foi realizada adicionando-se 200 µL de ácido acético glacial a 33%. A formação de biofilme foi quantificada por meio da mensuração da DO em espectrofotômetro a 600 nm (NIELSEN *et al.*, 2018; SKYBERG *et al.*, 2007). Todos os testes foram realizados em triplicata, e a média dos resultados foi calculada.

Após a leitura, a densidade óptica da amostra (DOa) foi obtida calculando-se a média aritmética das absorvâncias dos três poços. Esse valor foi comparado a três desvios padrão acima da média das absorvâncias do controle negativo (DOcn). Com base nessa comparação, as cepas foram classificadas em quatro categorias diferentes: A) não produtora de biofilme ($DOa \leq DOcn$); B) fraco produtor de biofilme ($DOcn < DOa \leq 2 \times DOcn$); C) moderado produtor de biofilme ($2 \times DOcn < DOa \leq 4 \times DOcn$); e D) forte produtor de biofilme ($4 \times DOcn < DOa$) (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

4.6 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O método de difusão com discos foi utilizado para realizar o teste de sensibilidade a antibióticos, utilizando a metodologia de Kirby e Bauer (KB) (BAUER *et al.*, 1966). Foram testados onze antibióticos (Laborclin): Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Azitromicina (15 µg), Ceftiofur (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Enrofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg), Lincomicina/Espectinomicina (109 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Norfloxacina (10 µg) e Sulfazotrim (25 µg). As cepas isoladas foram inoculadas em tubos contendo caldo LB e incubadas a 37° C por 18 horas. Após a incubação, as culturas diluídas foram semeadas com auxílio de *swabs* estéreis em placas contendo ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA, Índia). Os discos antimicrobianos foram adicionados e as placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C. As placas foram lidas medindo-se o diâmetro dos halos de inibição, usando uma régua milimetrada. Um padrão de resistência de halo foi considerado segundo os documentos VET01S Padrões de Desempenho para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos com Discos e Diluição para Bactérias Isoladas de Animais, 6ª Edição e M100 Padrões de Desempenho para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, 33ª Edição estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2023a, 2023b).

4.7 Sequenciamento de genoma completo

Para o sequenciamento, as bibliotecas de DNA genômico foram preparadas com o kit Illumina DNA Prep - Nextera (Illumina, Inc., San Diego, EUA) e quantificadas com o Collibri Library Quantification Kit (Invitrogen Inc., Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Um sistema Nextseq (Illumina) foi usado para gerar leituras brutas com base em 300 ciclos, sequenciamento paired-end (2 x 150 pb *reads*).

Os dados brutos obtidos da plataforma MiSeq (Illumina) foram processados usando o escore de qualidade Phred (*Q score*). As leituras com Q menor que 20 foram removidas das análises. Adaptadores ou segmentos de sequências com qualidade ruim também foram descartados.

Após o QC, a montagem do genoma foi realizada usando o *pipeline* proprietário da empresa, oneshotWGS v1.9. O OneshotWGS v1.9 reúne um conjunto de ferramentas de bioinformática comumente utilizadas pela comunidade científica. Um desses programas é a montagem A5, que processa etapas adicionais para ajuste do adaptador, filtragem de qualidade e correção de erros para gerar *scaffolds* (COIL; JOSPIN; DARLING, 2015). Ao final das etapas de montagem, os segmentos quiméricos foram removidos (melhor montagem). As estatísticas de montagem (*scaffolds* totais, percentual de conteúdo de GC, N50, L50, etc) foram realizadas utilizando o *software* QUAST (GUREVICH *et al.*, 2013).

Os dados de sequenciamento e montagem do genoma foram depositados no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o número de acesso do *Bioproject* (PRJNA917297).

A anotação do genoma foi realizada no *software* Prokka (SEEMANN, 2014). Para esta etapa, foram utilizados bancos de dados proprietários customizados. Esses bancos de dados eram compostos de sequências de genes curadas obtidas de bancos de dados públicos, como Pfam, GenBank, nt/nt, etc. Um protocolo semelhante foi aplicado para genes de virulência e resistência.

As características das sequências dos genomas dos 63 isolados de *E. coli* sequenciados encontram-se na tabela do APÊNDICE A.

4.8 Análise *in silico*

4.8.1 Confirmação de espécie

Foi realizada a confirmação *in silico* da espécie e utilizada a melhor montagem para o processo de identificação da espécie, implementada pelo módulo *pipeline* da empresa, neogSpecies. Este módulo foi escrito em linguagem Python e aplicou-se uma análise de *Average Nucleotide Identity* (ANI) para estimar as espécies do genoma (*cutoff*: 97%). O método ANI é o método padrão para definir uma espécie procariótica (RICHTER *et al.*, 2016).

4.8.2 Identificação de sorogrupo

A determinação do sorogrupo foi realizada utilizando todos os dados de sequenciamento do genoma da amostra e o programa *Sorotypefinder* 2.0 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508402/>) foi usado para predição do sorogrupo.

4.8.3 Detecção de genes de virulência

A partir dos dados obtidos no sequenciamento de genoma completo, foi realizada a predição de genes de virulência utilizando o programa *virulencefinder* 2.0 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24574290/>) com mínimo de identidade de 90%.

4.8.4 Detecção de genes de resistência a antimicrobianos e desinfetantes

A presença de genes de resistência antimicrobiana foi avaliada com os dados de sequenciamento completo do genoma das amostras, utilizando o programa Abricate 1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>), com a versão do banco de dados Resfinder (2022-maio-24) com cobertura mínima e identidade de 80% (ZANKARI *et al.*, 2012).

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Jamovi versão 2.3.28. O teste qui-quadrado foi aplicado para permitir a comparação de resistência antimicrobiana fenotípica, genes de resistência antimicrobiana e capacidade de formação de biofilme, utilizando a comparação de Pearson, com $p < 0.05$ indicando significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Histórico dos lotes

Dos lotes analisados, 61% apresentaram histórico de problemas respiratórios, septicemia e/ou mortalidade. Durante a coleta amostral, 42% dos lotes exibiram sinais clínicos respiratórios, como estertores, espirros, secreção e corrimento nasal, alargamento do seio infraorbitário e cabeça inchada.

Entre os lotes provenientes dos estados da região Sul, 13,3% utilizaram antibióticos durante a fase de alojamento das aves. Os fármacos utilizados foram ciprofloxacina, sulfaclopiridazina+trimetoprim e florfenicol. Na região Sudeste, apenas um lote (5%) apresentou sinais clínicos, sendo tratado com ciprofloxacina no dia da coleta.

5.2 Isolamento de *E. coli*

Em um total de 100 lotes aviários foram coletadas 1000 amostras respiratórias, 300 amostras de fêmur, 300 amostras de baço e 300 amostras de fígado de aves/carcaças necropsiadas e avaliadas quanto a presença de *E. coli* (Figura 4).

Figura 4 – Colônia típica de *E. coli* isolada em ágar MacConkey.



Fonte: elaborado pela autora

A Tabela 2 resume as positivities e a prevalência de colônias características de *E. coli* por estado conforme a amostra analisada.

Tabela 2 – Resultados da frequência de colônias características de *E. coli* em amostras de aves de corte produzidas no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Ceará.

Estado da Federação	Swab Respiratório (%/N)	Fígado (%/N)	Baço (%/N)	Fêmur (%/N)
PR	100% (30/30)	86% (26/30)	83% (25/30)	73% (21/30)
SC	60% (9/15)	53% (8/15)	73% (9/15)	46% (6/15)
RS	80% (12/15)	80% (12/15)	46% (6/15)	60% (9/15)
SP	30% (6/10)	80% (7/10)	80% (3/10)	70% (9/10)
MG	90% (9/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
CE	100% (20/20)	40% (8/20)	45% (9/20)	50% (10/20)

Fonte: elaborado pela autora

Dos *swabs* nasotraqueais obteve-se um total de 86 isolados de *E. coli*, do fígado e baço tem-se 71 e 62 isolados de *E. coli*, respectivamente. Nos fêmures obteve-se um total de 65 isolados de *E. coli*.

5.3 MALDI-TOF para confirmação de espécie

Utilizando os programas MALDI Biotyper (eDT), os isolados obtidos de *swab* nasotraqueal, fígado e baço foram analisados. Dos 86 isolados obtidos dos *swabs*, 88,37% foram identificados como *Escherichia coli*, 3,94% dos isolados foram identificados como *Enterobacter hormaechei*. Dos 71 isolados de fígado, 87,32% foram identificados como *Escherichia coli*, 1,4% foram identificados como *Enterobacter hormaechei*, 3,22% como

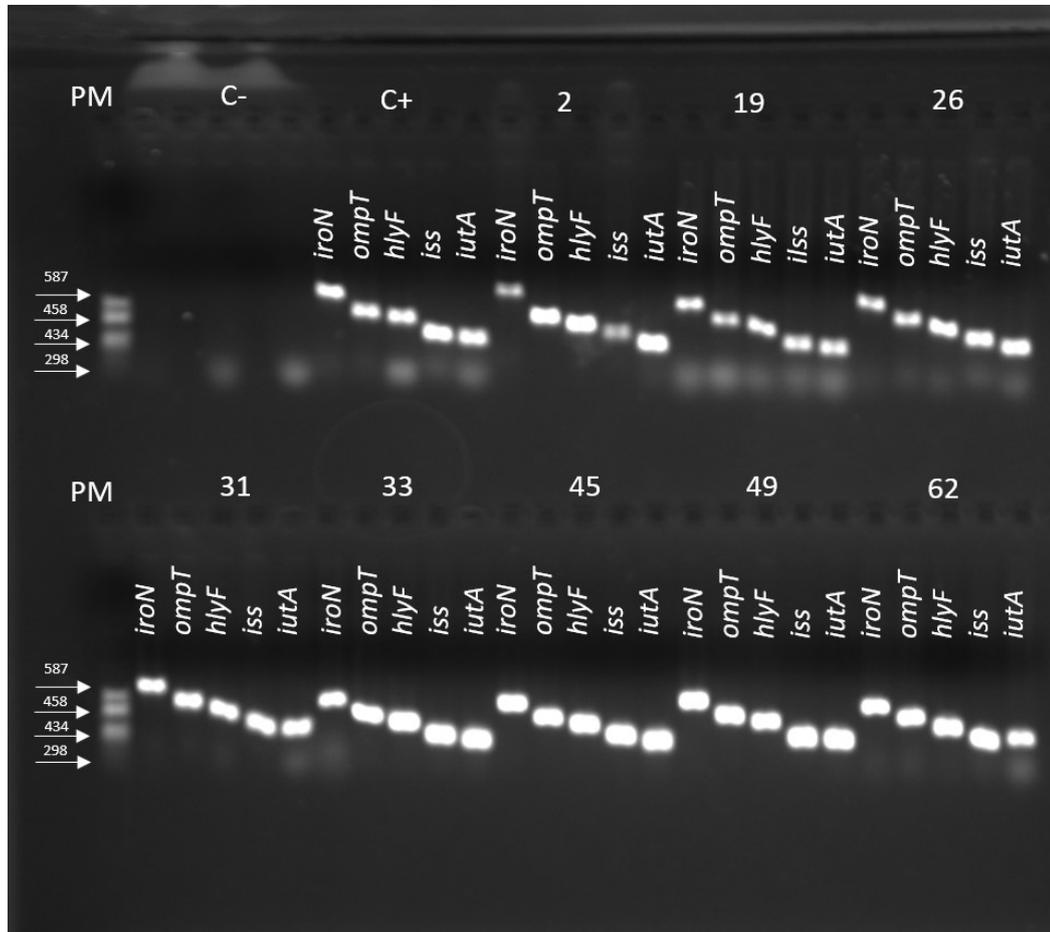
Leclercia adecarboxylatae 1,40% como *Enterobacter cancerogenus*. Já dos 62 isolados obtidos de baço, 88,70% foram identificados como *Escherichia coli* e 1,81% como *Enterobacter hormaechei*. Ao todo, não foi possível realizar a identificação de 7 isolados de swab, 5 de fígado e 6 de baço. Todas as espécies identificadas, *Escherichia coli*, *Enterobacter hormaechei*, *Leclercia adecarboxylata* e *Enterobacter cancerogenus*, são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

5.4 Confirmação molecular de APEC

Um total de 65 isolados característicos de *E. coli* foram obtidos dos fêmures. Destes, 63 isolados foram selecionados e submetidos ao sequenciamento de genoma completo. Por meio do sequenciamento, os 63 (100%) isolados foram identificados como *Escherichia coli*.

Por meio da PCR qualitativa, dos 63 isolados de *E. coli*, 58 (92%) apresentavam entre três e cinco dos genes considerados preditores mínimos de virulência para cepas APEC, estabelecendo, assim, sua confirmação como APEC (Figura 5). Comparativamente, na Polônia, um estudo demonstrou que 43% de todas as cepas testadas foram caracterizadas como APEC, no norte do Egito 51,85% desses lotes foram positivos para APEC enquanto no Nepal 90% dos isolados de colibacilose foram identificados como APEC (AWAD *et al.*, 2020; SUBEDI *et al.*, 2018; WILCZYŃSKI *et al.*, 2022).

Figura 5 – Imagem fotográfica de gel de agarose a 1% demonstrando os cinco preditores mínimos de virulência de APEC, utilizando o marcador de PM (peso molecular) LMW e os genes *iroN* (667 pb), *ompT* (496 pb), *hlyF* (450 pb), *iss* (323 pb) e *iutA* (302 pb); C- (controle negativo); C+ (controle positivo).



Fonte: elaborado pela autora

Dos 63 isolados analisados, 40 (63,4%) apresentaram os cinco genes, 14 (22,2%) apresentaram quatro genes, quatro (6,3%) apresentaram três genes e quatro (6,3%) apresentaram entre um e dois genes. Dos isolados APEC, 96,5% apresentavam os genes *ompT* e o gene *iss*, 93,1% *hlyF*, 94,8% o gene *iutA* e 89,6% *iroN*. Outros estudos realizados no Brasil, com galinhas e perus, descreveram valores semelhantes, nos quais a prevalência de APEC nos isolados foi de 58,6% e 84,34%. A frequência gênica foi de 98,8% para *iroN*, 96,3% para *iss*, *iutA* 81,5%, *hlyF* 100% e 100% para *ompT*, 92,5% para *iroN*, *iss* 92,5%, *iutA* 92,5%, *hlyF* 100% e 100% para *ompT*, respectivamente (DE CARLI *et al.*, 2015; HOEPERS, 2016). Enquanto Awad *et al.* (2020) encontrou os genes *iss* (93,3%) e *iutA* (46,6%).

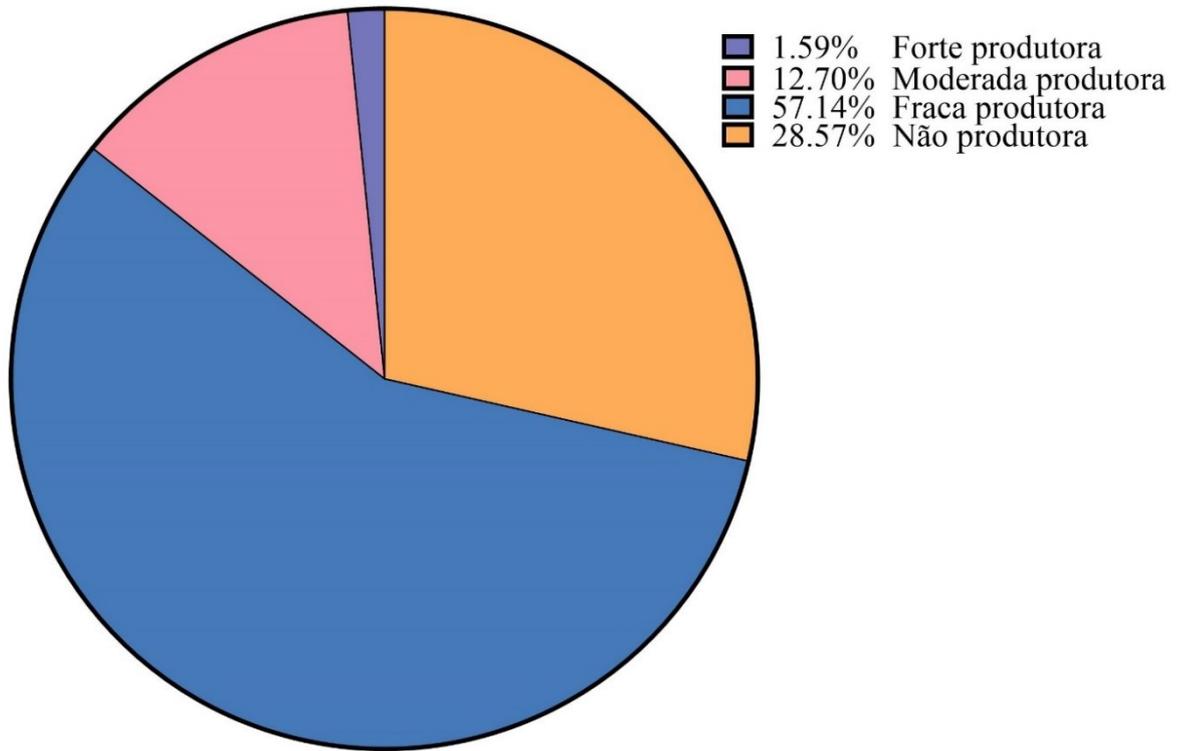
É importante ressaltar que o uso dos cinco genes de virulência isoladamente não é capaz de determinar a capacidade de virulência das cepas. Johnson e colaboradores (2022)

propuseram correlacionar a presença dos dois marcadores plasmidiais APEC *hlyF* e *ompT*, que estão entre os plasmídeos mais conservados, associados à tipagem de sequência multilocus (MLST) ou sorogrupo, para identificar cepas APEC altamente virulentas (JOHNSON *et al.*, 2022). Neste estudo, os isolados foram obtidos do fêmur, órgão naturalmente asséptico, até porque indica o potencial da bactéria ser altamente patogênica, pois para atingir o fêmur, o agente tinha capacidade de atingir a corrente sanguínea. Aliado a isso, foi utilizada a triagem por PCR com os cinco genes estabelecidos por Johnson *et al.* (2008), associado à identificação dos sorogrupos desses isolados.

5.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de fêmures

A capacidade de formação de biofilmes é um dos principais fatores de virulência de diferentes espécies bacterianas, já que atua como fonte de nutrientes e auxilia na proteção contra diversos fatores, como dessecação, agentes antimicrobianos e desinfetantes. A matriz extracelular pode atuar como uma barreira física, impedindo a penetração eficaz de antimicrobianos. Além de permitir a transferência horizontal de genes de resistência (SHARMA *et al.*, 2016). Dos isolados testados, 71,43% demonstraram a capacidade de formar biofilme, destes, 57,14% foram classificados como fracos formadores de biofilme, 12,70% foram classificados como moderados formadores e 1,59% como fortes formadores de biofilme. Enquanto 28,57% dos isolados não formaram biofilmes. A Figura 6 demonstra os dados descritos acima.

Figura 6 – Distribuição dos isolados de acordo com a capacidade de formação de biofilme.



Fonte: elaborado pela autora

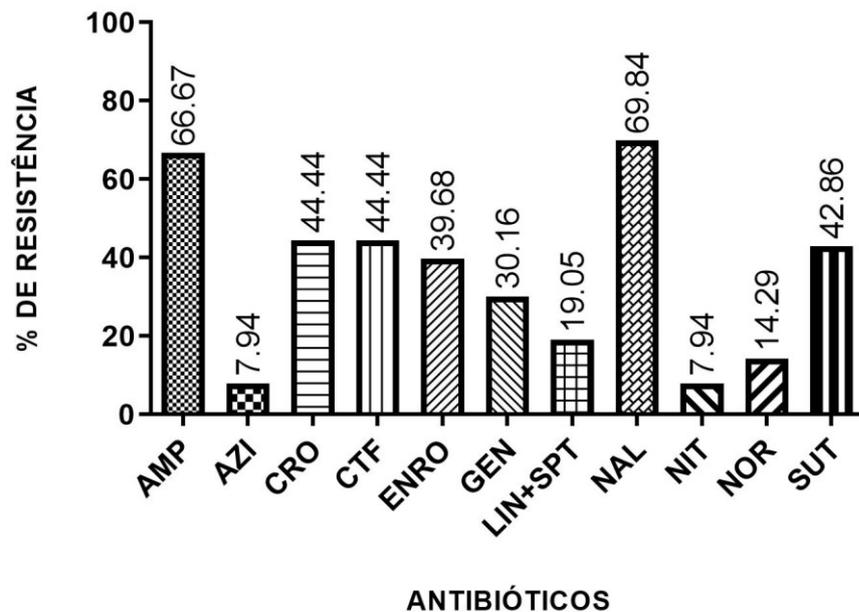
Em estudo desenvolvido na República Tcheca, 68% dos isolados demonstraram capacidade de formação de biofilme, sendo 22% forte formadores, 21% moderado e 25% fracos produtores de biofilme (PAVLICKOVA *et al.*, 2017). Rodrigues *et al.* (2019) analisaram 238 APEC isolados oriundos de cama de frango, lesões de celulite e doenças respiratória, destes, 55,8% foram classificados como produtores de biofilme, 63,8% isolados APEC eram produtores moderados a fortes, enquanto 17 (36,2%) isolados APEC eram produtores fracos a não produtores. Grakh *et al.* (2022) analisaram isolados de APEC e do ambiente, destes 63,8% isolados APEC eram produtores moderados a fortes de biofilme e 36,2% dos isolados APEC eram produtores fracos a não produtores. Ao contrário do encontrado neste trabalho, em que a maioria dos isolados é fraco formador de biofilme, Newman *et al.* (2021) descreveu que 16,39% dos isolados de aves com colibacilose foram classificados como fortes formadores de biofilme, 40,98% como moderados, 37,7% como fracos e 4,91% como não formadores de biofilme.

5.6 Teste de sensibilidade à antimicrobianos

Para este estudo, foram selecionados os antibióticos mais amplamente utilizados na avicultura, sendo que alguns destes são utilizados no tratamento de seres humanos, como a ceftriaxona, nitrofurantoína e o sulfazotrim.

Os diâmetros obtidos (APÊNDICE B) foram comparados com os pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023a, 2023b). Os índices de resistência geral encontrados (Figura 7) foram de 66,67% para Ampicilina, 7,94% para Azitromicina, 44,44% para Ceftriaxona, 44,44% para Ceftiofur, 39,68% para Enrofloxacina, 30,16% para Gentamicina, 19,95% para Lincomicina/Espectinomicina, 69,84% para Ácido Nalidíxico, 7,94% para Nitrofurantoína, 14,29% para Norfloxacina e 42,86% para Sulfazotrim.

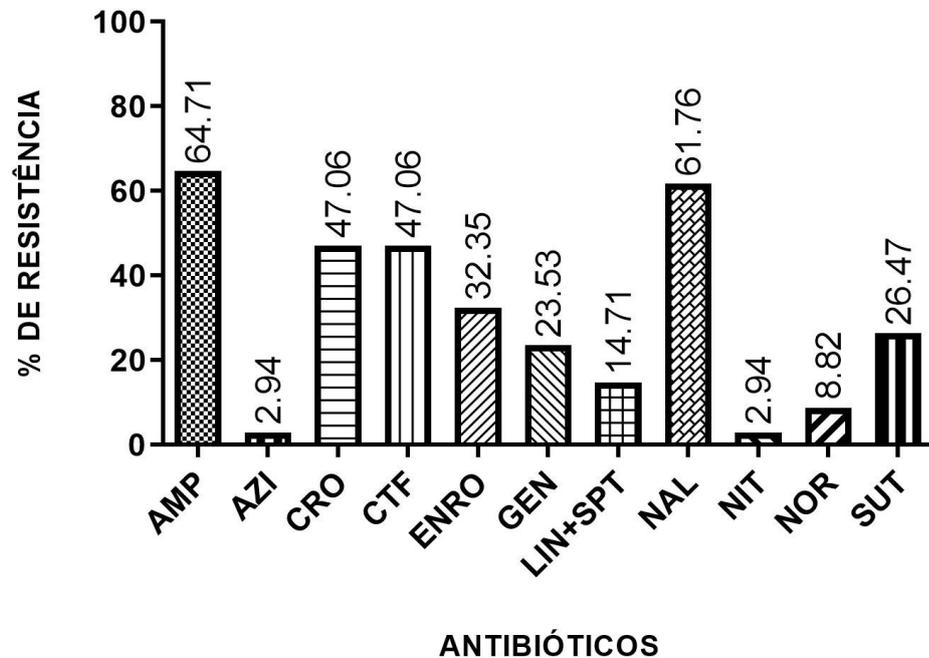
Figura 7 – Resistências apresentadas pelos 63 isolados frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT).



Fonte: elaborado pela autora

Na região Sul (Figura 8), as taxas de resistência encontradas para os isolados de *E. coli* foram de 64,71% para Ampicilina, 2,94% para Azitromicina, 47,06% para Ceftriaxona, 47,06% para Ceftiofur, 32,35% para Enrofloxacina, 23,53% para Gentamicina, 14,71% para Lincomicina/Espectinomicina, 61,76% para Ácido Nalidíxico, 2,94% para Nitrofurantoína, 8,82% para Norfloxacina e 26,47% para Sulfazotrim.

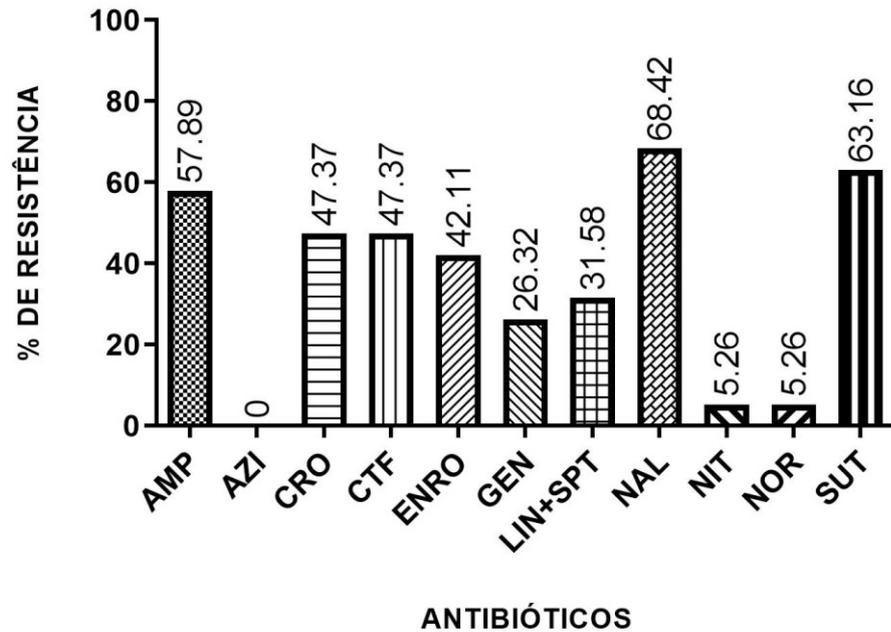
Figura 8 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Sul frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT).



Fonte: elaborado pela autora

Na região Sudeste (Figura 9), os resultados encontrados para os isolados de *E. coli* indicam resistência à Ampicilina de 57,89%, 47,37% à Ceftriaxona, 47,37% ao Ceftiofur, 44,11% à Enrofloxacina, 26,32% à Gentamicina, 31,58% à Lincomicina/Espectinomicina, 68,42% ao Ácido Nalidíxico, 5,26% para Nitrofurantoína, 5,26% para Norfloxacina e 63,16% para Sulfazotrim, todos os isolados foram sensíveis à Azitromicina.

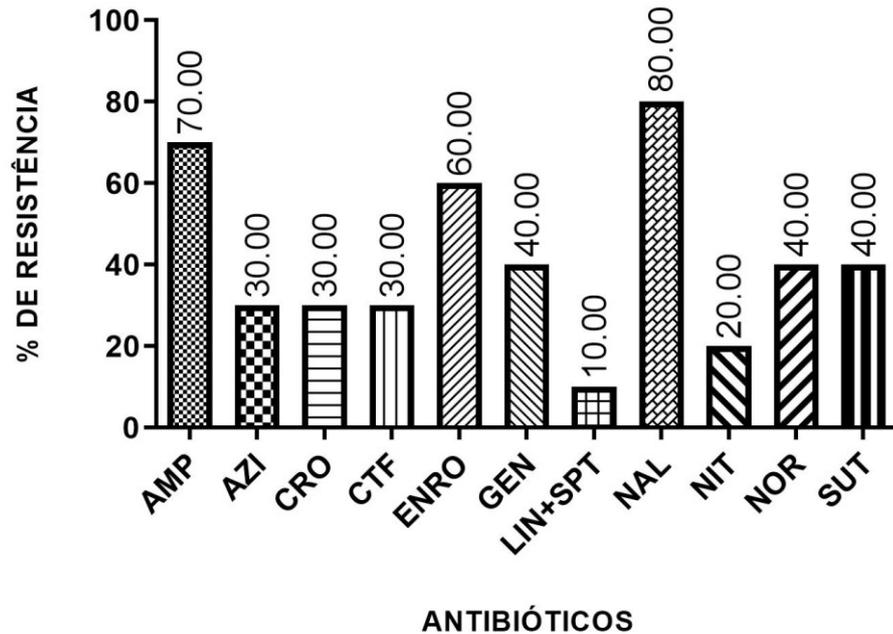
Figura 9 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Sudeste frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT).



Fonte: elaborado pela autora

Na região Nordeste (Figura 10), os índices de resistência encontrados para os isolados de *E. coli* indicam resistência à Ampicilina de 70%, 30% para Azitromicina, 30% para Ceftiofur, 30% para Ceftriaxona, 60% para Enrofloxacina, 40% para Gentamicina, 10% para Lincomicina/Espectinomicina, 80% para Ácido Nalidíxico, 20% para Nitrofurantoína, 40% para Norfloxacina e 40% para Sulfazotrim.

Figura 10 – Resistências apresentadas pelos isolados dos estados da região Nordeste frente aos antimicrobianos testados, onde: Ácido Nalidíxico (NAL), Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Ceftiofur (CFT), Ceftriaxona (CRO), Enrofloxacina (ENRO), Gentamicina (GEN), Lincomicina/Espectinomicina (LIN/SPT), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR) e Sulfazotrim (SUT).



Fonte: elaborado pela autora

Ao realizar o teste qui-quadrado (APÊNDICE C), encontrou-se associações significativas ($p < 0,05$) entre a resistência fenotípica ao ceftiofur e ceftriaxona, ácido nalidíxico, enrofloxacina e ampicilina. Entre o ácido nalidíxico, ampicilina enrofloxacina e ceftriaxona. Entre norfloxacina e os antibióticos enrofloxacina e ácido nalidíxico. Entre a enrofloxacina e o sulfazotrim.

Ceftiofur e ceftriaxona são cefalosporinas de terceira geração semelhantes em estrutura, porém o primeiro é amplamente utilizado na avicultura enquanto o segundo é utilizado no tratamento em humanos (FAN *et al.*, 2021; WAGNER *et al.*, 2011).

A resistência de *Escherichia coli* a diferentes classes de antimicrobianos tem sido descrita. Cepas APEC são frequentemente resistentes a tetraciclina, sulfonamidas, ampicilina e estreptomicina. No entanto, esse perfil de resistência varia conforme a localização geográfica

e as características das aves (KATHAYAT *et al.*, 2021; NOLAN *et al.*, 2020; RABELLO *et al.*, 2020).

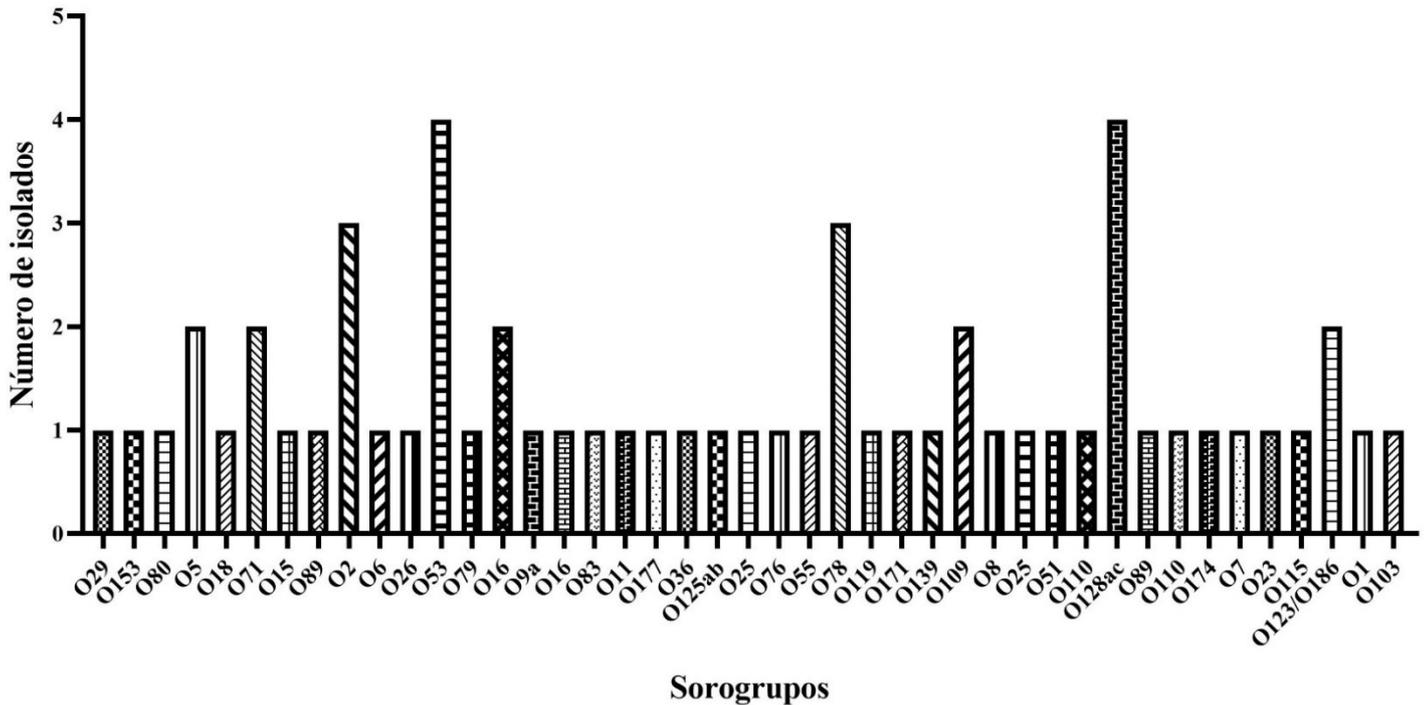
Os antibióticos selecionados para o presente estudo são os mais utilizados em aves, além de serem utilizados para tratamento em humanos. Todos (100%) os isolados de *E. coli* são resistentes a, pelo menos, um antibiótico, apresentando diferentes perfis de resistência a antibióticos e 60% das cepas apresentaram resistência a mais de três classes de antibióticos, sendo consideradas multirresistentes. No Brasil, taxas de multirresistência de 54,6%, 78,9%, 94,2% e 71%, respectivamente, foram observadas em APEC isolados de casos de aerossaculite, celulite, em aves comerciais e isolados de carcaças de frango (BARBIERI *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2012; CARDOSO; TESSARI; LUCIANO, 2019; CYOIA *et al.*, 2019). Em outros países, taxas de multirresistência de 100%, 80% e 81,1% (AFAYIBO *et al.*, 2022; RACEWICZ *et al.*, 2022; THOMRONGSUWANNAKIJ *et al.*, 2022) já foram descritas.

Quinolonas e fluoroquinolonas são as drogas de primeira escolha no tratamento de aves e são amplamente utilizadas na avicultura. A maior taxa de resistência foi encontrada para o ácido nalidíxico, que apresentou uma taxa de resistência de 69,84%, semelhante às taxas descritas em outros estudos realizados no Brasil (CYOIA *et al.*, 2019; KORB *et al.*, 2015), e de estudos realizado em frangos de corte na Coreia e no sul da Tailândia (KIM *et al.*, 2020; THOMRONGSUWANNAKIJ *et al.*, 2022).

5.7 Sorogrupos

O sequenciamento de genoma completo foi utilizado para determinar os sorogrupos de *E. coli*. Foi possível determinar o sorotipo de um total de 60 (92%) isolados, distribuídos em 40 sorogrupos (Figura 11). Os sorogrupos predominantes foram O128 e O53, ambos com frequência de 6,8%. Os sorogrupos O78 e O16 ocorreram com frequência de 5,1%, enquanto O2, O25, O5, O110, O71 e O109 ocorreram com frequência de 3,4%. Os demais sorogrupos aparecem em menor frequência (1,7%).

Figura 11 – Distribuição dos isolados testados nos diferentes sorogrupos.



Fonte: elaborado pela autora

Diferentes sorogrupos O foram associados à colibacilose, todavia os mais comuns associados a esses casos, encontrados em diferentes estudos ao redor do mundo são O78, O2, O1, O18, O35, O36, O109, O115, O111 (MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021; NOLAN *et al.*, 2020). No presente estudo a soma da prevalência destes sorogrupos mais prevalentes representa um total de 18,7% dos isolados do presente estudo que foram classificados.

Os sorogrupos O128 e O53 não são os mais associados a casos de colibacilose, porém foram os mais prevalentes nos isolados analisados no presente trabalho. Trabalhos anteriores caracterizaram isolados de frangos de corte com histórico de sintomas respiratórios e pericardite, peri-hepatite e aerossaculite como pertencentes ao sorogrupo O128 (CASALINO *et al.*, 2023; KHAFAGY; EID; MOHAMMED, 2019). Em outro estudo, que utilizou amostras de aves com lesões características de colibacilose, 8,9% dos isolados avaliados pertenciam ao sorogrupo O53 (KIM *et al.*, 2020).

Tais dados demonstram a diversidade de sorogrupos das cepas APEC. Dentre os fatores que podem influenciar a variação geográfica desses sorogrupos, destacam-se a diversidade genética das cepas bacterianas e a exposição a diversas fontes de infecção (MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021; NOLAN *et al.*, 2020).

5.8 Detecção e distribuição de genes associados à virulência

Assim como as demais *Escherichia coli* patogênicas, cepas APEC abrigam uma ampla variedade de genes de virulência, que as distinguem de cepas comensais, dentre eles, os dez mais frequentemente associados a cepas APEC são *iss*, *tsh*, *iroN*, *ompT*, *iutA*, *cvaC*, *hlyF*, *iucD*, *papG* *allele* (II/III) e *papC* (OVI et al., 2023). Esses genes localizam-se em cromossomos ou plasmídeos, como os plasmídeos ColV e ColBM. Os fatores de virulência comumente associados a cepas APEC incluem adesinas, toxinas, mecanismos de aquisição de ferro, invasinas e plasmídeos (MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021; NEWMAN *et al.*, 2021; NOLAN *et al.*, 2020).

Os isolados sequenciados abrigavam de 4 a 27 genes de virulência e a prevalência dos genes de virulência variou de 1,58% a 100%. Dos isolados sequenciados, 88% abrigavam ao menos um gene relacionado à adesão (*eae*, *papA_F11*, *papA_F19*, *papA_F20*, *papC*, *hra*, *iha*, *lpfA* e *tsh*). Enquanto 93,65% abrigavam ao menos um gene relacionado a sistemas de aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *irp2*, *iroN*, *iucC*, *iutA*, *sitA*). Com relação aos fatores de resistência ao soro, 96,82% dos isolados abrigavam ao menos um gene de virulência (*iss*, *kpsE*, *kpsMII*, *kpsMIII_K98*, *kpsMII_K1*, *kpsMII_K5*, *neuC*, *ompT*, *traT*). Todas os isolados abrigavam ao menos um gene codificando toxinas (*astA*, *cma*, *cvaC*, *hlyE*, *hlyF*, *usp*, *vat*). A Tabela 3 abrange os genes de virulência encontrados e sua prevalência.

Tabela 3 – Prevalência de genes de virulência nos isolados de *Escherichia coli*.

Gene, operon ou região	Descrição	Prevalência (%)
Adesinas		
<i>eae</i>	<i>Intimin</i>	1,58
<i>papA_F11</i>	<i>Major pilin subunit F11</i>	3,17
<i>papA_F19</i>	<i>Major pilin subunit F19</i>	1,58

<i>papA_F20</i>	<i>Major pilin subunit F20</i>	11,11
<i>papC</i>	<i>Pilus associated with pyelonephritis</i>	23,80
<i>hra</i>	<i>Heat-resistant agglutinin</i>	69,84
<i>iha</i>	<i>Adherence protein</i>	12,69
<i>lpfA</i>	<i>Long polar fimbriae</i>	60,31
<i>tsh</i>	<i>Temperature-sensitive hemagglutinin</i>	34,92

Invasinas

<i>ibeA</i>	<i>Invasion of brain endothelium</i>	1,58
-------------	--------------------------------------	------

Resistência ao soro

<i>cvaC</i>	<i>Structural genes of colicin V operon (Microcin ColV)</i>	30,15
<i>kpsE</i>	<i>Capsule polysaccharide export inner-membrane protein</i>	11,11
<i>kpsMII</i>	<i>ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export systems permease; Group 3 capsule</i>	4,76
<i>kpsMIII_K98</i>	<i>Polysialic acid transport protein; Group 2 capsule</i>	1,58
<i>kpsMII_K1</i>	<i>Polysialic acid transport protein; Group 2 capsule</i>	1,58
<i>kpsMII_K5</i>	<i>Polysialic acid transport protein; Group 2 capsule</i>	3,17

<i>neuC</i>	<i>Polysialic acid capsule biosynthesis protein</i>	3,17
-------------	---	------

<i>traT</i>	<i>Outer membrane protein complement resistance</i>	82,53
-------------	---	-------

**Sistemas de aquisição
de ferro**

<i>chuA</i>	<i>Heme receptor gene (E. coli haem utilization)</i>	41,26
-------------	--	-------

<i>fyuA</i>	<i>Siderophore receptor</i>	31,74
-------------	-----------------------------	-------

<i>ireA</i>	<i>Siderophore receptor</i>	20,63
-------------	-----------------------------	-------

<i>irp2</i>	<i>Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)</i>	31,74
-------------	--	-------

<i>iucC</i>	<i>Aerobactin synthetase</i>	53,96
-------------	------------------------------	-------

<i>sitA</i>	<i>Iron transport protein</i>	61,90
-------------	-------------------------------	-------

Toxinas

<i>astA</i>	<i>EAST-1 heat-stable toxin</i>	39,68
-------------	---------------------------------	-------

<i>cma</i>	<i>Structural gene for CoIM activity</i>	23,80
------------	--	-------

<i>hlyE</i>	<i>Avian E.coli haemolysin</i>	77,77
-------------	--------------------------------	-------

<i>usp</i>	<i>Uropathogenic-specific protein (bacteriocin)</i>	3,17
------------	---	------

<i>vat</i>	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>	15,87
------------	--	-------

**Outros fatores de
virulência**

<i>air</i>	<i>Enteroaggregative immunoglobulin repeat protein</i>	12,69
<i>pic</i>	<i>Serin protease autotransporter</i>	17,46
<i>eilA</i>	<i>Salmonella HilA homolog</i>	12,69
<i>espA</i>	<i>Type III secretions system</i>	1,58
<i>espB</i>	<i>Secreted protein B</i>	1,58
<i>espF</i>	<i>Type III secretion system</i>	1,58
<i>espJ</i>	<i>Prophage-encoded type III secretion system effector</i>	1,58
<i>etpD</i>	<i>Type II secretion protein</i>	1,58
<i>etsC</i>	<i>Putative type I secretion outer membrane protein</i>	73,01
<i>capU</i>	<i>Hexosyltransferase homolog</i>	1,58
<i>cba</i>	<i>Colicin B</i>	3,17
<i>cea</i>	<i>Colicin E1</i>	17,46
<i>celb</i>	<i>Endonuclease colicin E2</i>	4,76
<i>cia</i>	<i>Colicin ia</i>	30,15

<i>cib</i>	<i>Colicin ib</i>	17,46
<i>cif</i>	<i>Type III secreted effector</i>	1,58
<i>gad</i>	<i>Glutamate decarboxylase</i>	100
<i>mchB</i>	<i>Microcin H47 part of colicin H</i>	1,58
<i>mchC</i>	<i>MchC protein</i>	1,58
<i>mchF</i>	<i>ABC transporter protein MchF</i>	23,80
<i>mcmA</i>	<i>Microcin M part of colicin H</i>	1,58
<i>nleA</i>	<i>Non-LEE encoded effector A</i>	1,58
<i>nleB</i>	<i>Non-LEE encoded effector B</i>	1,58
<i>tccP</i>	<i>Tir-cytoskeleton coupling protein</i>	1,58
<i>terC</i>	<i>Tellurium ion resistance protein</i>	100
<i>tir</i>	<i>Translocated intimin receptor protein</i>	1,58
<i>yfcV</i>	<i>Fimbrial protein</i>	6,34

Fonte: elaborado pela autora

Os genes *gad* (*Glutamate decarboxylase*) e *terC* (*Tellurium ion resistance protein*) foram detectados em 100% dos isolados.

O telurito, um oxianion do telúrio, é um elemento tóxico para as bactérias devido a sua capacidade oxidativa. Todavia, *Escherichia coli* mostra-se altamente resistente ao telurito, dentre os genes associados à resistência, tem-se *terB*, *terC*, *terF*, *terX*, *terY3* (NGUYEN *et al.*,

2021). Estudos anteriores descreveram a presença do gene *terC* em todos os isolados analisados (JONARE *et al.*, 2023; TOFANI *et al.*, 2022).

A glutamato descarboxilase (GAD) transforma o glutamato (Glu) e um próton em ácido γ -aminobutírico (GABA) e dióxido de carbono, com o piridoxal 5'-fosfato (PLP) atuando como cofator (DE BIASE *et al.*, 1999; HOU *et al.*, 2018). O sistema *gad* é um mecanismo comum encontrado em bactérias que lhes permite sobreviver e se adaptar a ambientes ácidos (HOU *et al.*, 2018). Tofani *et al.* (2022) descreveu a presença do gene *gad* em 100% dos isolados testados.

Para além dos cinco genes utilizados como preditores mínimos, diversos estudos descrevem outros genes que podem ser associados à APEC dentre eles *iucD*, *hlyE*, *irp2*, *papC*, *cva/cvi* e *tsh* (MEHAT; VAN VLIET; LA RAGIONE, 2021; OVI *et al.*, 2023).

Genes que codificam adesinas estão relacionados aos processos de adesão, motilidade, formação de biofilme e a sobrevivência em macrófagos. Dos isolados, 69,84% abrigavam o gene *hra*, 60,31% o gene *lpfA* e 34,92% o gene *tsh*. O gene *pap* foi detectado em 23,80%, estudos anteriores descreveram a presença do gene em 15% dos isolados sistêmicos e 26% dos isolados de celulite (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A capacidade de resistir ao soro é um dos fatores relacionados a cepas APEC, 96,82% dos isolados abrigavam genes relacionados à resistência sérica, dentre eles 82,53% abrigavam o gene *traT*, estudos anteriores detectaram o gene *traT* em 82% dos isolados sistêmicos e 62,29% em isolados de casos de colibacilose, respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; NEWMAN *et al.*, 2021).

Genes relacionados à aquisição de ferro foram detectados em 59 isolados, dentre eles os mais prevalentes foram *chuA* (41,26%), *fyuA* (31,74%), *iucC* (53,96%), *irp2* (31,74%) e *sitA* (61,90%). A presença do gene *fyuA* foi detectada em 32,78% dos isolados de casos de colibacilose e 45% dos isolados sistêmicos, respectivamente (DE CARLI *et al.*, 2015; NEWMAN *et al.*, 2021).

O gene *cvaC* relaciona-se a produção de colicinas, e é comumente encontrado em cepas extraintestinais virulentas, porém, diferente do descrito por Rodriguez-Siek *et al.* (2005) que detectaram o gene em 66,8% do isolados de casos de colibacilose, no presente estudo, o gene foi detectado em 30,15% dos isolados, enquanto dois estudos detectaram o gene em 4% isolados obtidos de casos de celulite em perus e em 19,67% obtidos de casos de colibacilose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; NEWMAN *et al.*, 2021).

A *hly* é uma exotoxina proteica formadora de poro produzida por um sistema de secreção tipo I, que causa a lise de eritrócitos do hospedeiro para a liberação de ferro e sua

posterior captação pelo patógeno (KOLENDA *et al.*, 2021; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016). O gene *hlyE* foi detectado em 77,77% das amostras, enquanto estudos anteriores descreveram a presença do gene em 95,3%, 4% de isolados APEC, respectivamente (AZAM *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2010).

5.9 Detecção e distribuição de genes de resistência a antimicrobianos e desinfetantes

Dentre os isolados analisados, todos apresentam ao menos um ARG (Tabela 4), e todos eles (100%) abrigavam o gene *formA*. Os genes de resistência detectados em 20% ou mais dos isolados foram *sul2* (60,31%), *sitABCD* (57,14%), *sul1* (52,38%), *ant(3'')-Ia* (50,79%), *qacE* (50,79%), *aac(3)-VIa* (36,5%), *aph(6)-Id* (31,74%), *tet(A)* (31,74%), *tet(B)* (20,63%), *aadA2* (20,63%) e *aph(3'')-Ib* (20,63%).

Neste estudo, 78,1% dos isolados APEC abrigaram pelo menos um dos genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aac(3)-IId*, *aac(3)-IVa*, *aac(3)-VIa*, *aadA12*, *aadA2*, *aadA5*, *ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(4)-Ia*, and *aph(6)-Idii*).

Ao menos um dos genes de resistência previstos contra sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*) foi encontrado em 73,4% dos isolados.

Da mesma forma, ao menos um gene de resistência previstos contra β -lactâmicos foi encontrado em 64,06% dos isolados, dentre os genes têm-se *blaCMY-2*, *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-164*, *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-55*, *blaCTX-M-8*, *blaSHV-12*, *blaSHV-187*, *blaTEM-106*, *blaTEM-141*, *blaTEM-1A*, and *blaTEM-1B*.

Para os genes de resistência a tetraciclina, *tet(A)*, *tet(B)* e *tet(D)*, 48% dos isolados abrigavam pelo menos um dos genes de resistência à tetraciclina.

A Tabela 4 abrange as classes de antimicrobianos, os genes de resistência a antimicrobianos encontrados e sua prevalência.

Tabela 4 – Prevalência de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de *Escherichia coli*.

<i>Classe de antimicrobiano</i>	Gene de resistência a antimicrobianos	Prevalência	
<i>Aminoglicosídeos</i>	<i>aac(3)-IIId</i>	4,76	
	<i>aac(3)-IVa</i>	3,17	
	<i>aac(3)-VIa</i>	36,5	
	<i>aadA12</i>	1,58	
	<i>aadA2</i>	20,63	
	<i>ant(2'')-Ia</i>	7,93	
	<i>ant(3'')-Ia</i>	50,79	
	<i>aph(3')-Ia</i>	20,63	
	<i>aph(3'')-Ib</i>	31,74	
	<i>aph(4)-Ia</i>	3,17	
	<i>aph(6)-Id</i>	31,74	
	<i>Betalactâmicos</i>	<i>blaCMY-2</i>	9,52
		<i>blaCTX-M-1</i>	3,17
<i>blaCTX-M-15</i>		1,58	
<i>blaCTX-M-164</i>		1,58	
<i>blaCTX-M-2</i>		17,46	
<i>blaCTX-M-55</i>		9,52	
<i>blaCTX-M-8</i>		12,69	
<i>blaSHV-12</i>		1,58	
<i>blaTEM-106</i>		1,58	
<i>blaTEM-141</i>		6,34	

	<i>blaTEM-1A</i>	7,93
	<i>blaTEM-1B</i>	14,28
<i>Trimetoprim</i>	<i>dfrA1</i>	7,93
	<i>dfrA12</i>	4,76
	<i>dfrA14</i>	4,76
	<i>dfrA15</i>	4,76
	<i>dfrA7</i>	3,17
	<i>dfrA8</i>	3,17
<i>Fenicois</i>	<i>catA1</i>	3,17
	<i>cmlA1</i>	9,52
	<i>floR</i>	19,04
<i>Lincosamidas</i>	<i>lnu(A)</i>	4,76
	<i>lnu(F)</i>	7,93
<i>Colistina</i>	<i>mcr-1,5</i>	1,58
	<i>mcr-9</i>	1,58
<i>Macrolídeos</i>	<i>mph(A)</i>	1,58
	<i>mph(B)</i>	1,58
<i>Quinolonas</i>	<i>qnrA1</i>	1,58
	<i>qnrB19</i>	11,11
	<i>qnrS1</i>	6,34
<i>Sulfonamidas</i>	<i>sul1</i>	52,38
	<i>sul2</i>	60,31
	<i>sul3</i>	7,93
<i>Tetraciclinas</i>	<i>tet(A)</i>	31,74
	<i>tet(B)</i>	20,63

Outros	<i>tet(D)</i>	1,58
	<i>fosA</i>	6,25
	<i>fosA3</i>	1,5625
	<i>qacE</i>	50,79
	<i>sitABCD</i>	57,14
	<i>formA (Genbank Acc, No, X73835)</i>	100

Fonte: elaborado pela autora

Dentre os genes de resistência detectados, os que estiveram presentes em mais de 20% das amostras da região Sul foram *aac(3)-VIa* (35,29%), *aadA2* (26,47%), *ant(3'')-Ia* (50%), *aph(6)-Id* (29,41%), *blaCTX-M-2* (20,58), *sul1* (47,05%), *sul2* (47,05%) e *tet(A)* (29,41%).

Na região Sudeste, os genes mais prevalentes entre os lotes foram *aac(3)-VIa* (36,84%), *ant(3'')-Ia* (52,63%), *aph(3'')-Ib* (21,05%), *aph(6)-Id* (31,57%), *sul1* (63,15%), *sul2* (73,68%), *tet(A)* (31,57%) e *tet(B)* (26,31%).

Já na região Nordeste, os genes de resistência detectados em mais de 20% das amostras foram *aac(3)-Via* (40%), *aadA2* (20%), *ant(3'')-Ia* (50%), *aph(3'')-Ib* (40%), *aph(3')-Ia* (20%), *aph(6)-Id* (40%), *blaTEM-1* (20%), *blaTEM-1B* (20%), *dfrA12* (20%), *floR* (40%), *qnrB19_1* (20%), *sul1* (50%), *sul2* (80%), *tet(A)* (40%) e *tet(B)* (30%).

Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são amplamente utilizados para tratar infecções bacterianas em diversas espécies animais, incluindo aves. Esses antibióticos são eficazes contra uma variedade de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na indústria avícola, os aminoglicosídeos são frequentemente empregados na prevenção e tratamento de infecções respiratórias e entéricas causadas por bactérias Gram-negativas (VAN DUIJKEREN *et al.*, 2019). A gentamicina é um dos aminoglicosídeos mais utilizados na medicina veterinária. Uma alta presença de genes de resistência a aminoglicosídeos foi relatada neste estudo, muito semelhante às altas taxas descritas no Paquistão (AZAM *et al.*, 2020). Thomrongsuwannakij *et al.* (2022) descreveu a presença do gene *aac(3)-II* em apenas 5,1% dos isolados APEC.

A resistência às sulfonamidas pode ser explicada por sua ampla utilização no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos e sua ampla disponibilidade no mercado (PALMA; TILOCCA; RONCADA, 2020). Trabalhos anteriores descreveram prevalências de genes de resistência a sulfonamidas em 70% e 89,3% dos isolados, taxas

próximas ao descrito neste trabalho (AZAM *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2019a). Enquanto Thomrongsuwannakij *et al.* (2022) encontraram os genes de resistência à sulfonamidas, *sul1* e *sul2*, em 6,3% dos isolados e 25,3% dos isolados.

Devido à sua ampla disponibilidade e custo acessível, as tetraciclinas são uma classe de antibióticos comumente utilizados na medicina veterinária para tratar uma variedade de infecções bacterianas em animais. Elas são eficazes contra uma ampla gama de bactérias, incluindo tanto as Gram-positivas quanto as Gram-negativas, e são comumente utilizadas para tratar infecções respiratórias, do trato urinário e de pele em animais (PALMA; TILOCCA; RONCADA, 2020). Na Jordânia, Ibrahim *et al.* (2019a) demonstrou que 90,7% dos isolados de APEC abrigavam pelo menos um dos genes de resistência à tetraciclina (*tet A* e *tet B*), enquanto Newman *et al.*, (2021), demonstraram que 16,4% dos isolados de casos de colibacilose abrigavam genes de resistência à tetraciclina (*tetA*).

Os β -lactâmicos são amplamente utilizados na medicina veterinária. Um dos principais fatores envolvidos nas altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) por espécies da família *Enterobacteriaceae* (KRIZMAN *et al.*, 2017; PITOUT, 2008). O presente estudo indicou uma prevalência de 64,06% de isolados que abrigam pelo menos um gene de resistência contra β -lactâmicos. A presença do gene *blaTEM* foi encontrada em 43,3% dos isolados, Thomrongsuwannakij *et al.*, (2022) e Ibrahim *et al.* (2019a) descreveram a presença deste em 72,9% e 43,3% dos isolados, respectivamente.

A exposição constante a resíduos de desinfetantes em baixas concentrações pode resultar em maior tolerância bacteriana. Esse aumento na tolerância pode levar a uma maior resistência adaptativa bacteriana aos antibióticos e aos próprios desinfetantes, podendo aprimorar a capacidade de sobrevivência frente a diversos estresses ambientais (CHEN *et al.*, 2021; ROZMAN *et al.*, 2021). Estudos sugerem que há relação entre o uso desinfetantes e a transferência de genes de resistência a antimicrobianos (ITZEK *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2017; KAMPF, 2018). No presente trabalho encontrou-se três genes associados à resistência a desinfetantes utilizados na cadeia produtiva, estes são formaldeído, QACs e peróxido de hidrogênio.

Conforme o estudo de Kümmerle; Feucht; Kaulfers (1996), foi observado que certas cepas de *E. coli* possuem um mecanismo de resistência ao formaldeído que envolve a degradação enzimática do composto por uma variante da enzima presente em um plasmídeo. Em estudo realizado na Alemanha, a resistência fenotípica ao formaldeído foi associada à

presença desse gene (ROEDEL *et al.*, 2021). Neste estudo, todas as cepas analisadas continham um gene de formaldeído desidrogenase.

Os QACs são amplamente utilizados na indústria avícola devido à sua baixa toxicidade relativa, boas propriedades antibacterianas, não irritantes, não corrosivos e de baixa toxicidade e razoavelmente eficazes na presença de matéria orgânica (IBRAHIM *et al.*, 2019b). O gene *qacE* é amplamente difundido em bactérias Gram-negativas, principalmente em *Enterobacteriaceae*. Neste estudo, 50,79% das cepas APEC continham o gene *qacE*. A presença do gene *qacEΔ1*, descrito como uma mutação de deleção *qacE*, foi descrita em alguns estudos e aparece com uma frequência relativamente alta em isolados (IBRAHIM *et al.*, 2019b; LI *et al.*, 2021; ZOU *et al.*, 2014).

O operon SitABCD foi inicialmente descrito em *Salmonella enterica* e é composto por quatro regiões distintas. O gene *sitA* codifica uma proteína de ligação periplasmática responsável por capturar o manganês e o ferro. O gene *sitB* codifica o componente de ligação do ATP, que fornece energia para o transporte dos íons através da membrana celular. O gene *sitC* codifica uma permease, que atua no transporte ativo dos íons através da membrana. Por fim, o gene *sitD* codifica o componente da membrana interna do sistema, auxiliando no transporte e na incorporação dos íons no citoplasma bacteriano. Em conjunto, esses genes formam um sistema de transporte ABC que confere resistência aos efeitos bactericidas do peróxido de hidrogênio, além de desempenhar um papel importante na captação e homeostase de manganês e ferro nas células bacterianas (SABRI; LÉVEILLÉ; DOZOIS, 2006). No presente estudo, 57,14% dos isolados abrigavam o gene *sitABCD*, em casos de mortalidade de aves com colibacilose, foi observado que em 71,3% dos isolados bacterianos, o gene *sitABCD* estava presente (LOZICA *et al.*, 2022).

Ao realizar a análise do teste qui-quadrado (APÊNDICE C) para a capacidade de formação do biofilme, foi observada uma associação significativa ($p < 0,05$) entre a resistência fenotípica ao ceftiofur, e os genes de resistência a antimicrobianos *aph(3'')-Ib*, *dfrA14*, *dfrA7*, *sitABCD*, *sul2*.

As análises utilizando o teste qui-quadrado (APÊNDICE C) para a resistência antimicrobiana genotípica e fenotípica em todas as cepas de APEC revelaram associações significativas ($p < 0,05$) entre os genes de resistência *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *blaCTX-M-8*, *sitABCD*, *sul2* e a ceftriaxona, *aac(3)-IVa*, *aph(4)-Ia*, *blaSHV-12*, *dfrA1*, *floR* e a azitromicina, *blaTEM-106*, *dfrA7*, *sul2* e a nitrofurantoína. Entre os genes *blaSHV-12*, *cmlA1*, *dfrA12*, *mcr-1.5*, *mph(A)*, *sul1*, *sul3* e a norfloxacin. Entre o sulfazotrim e os genes *floR*, *qacE*, *sul1* e *sul2*. Enrofloxacin e os genes *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *dfrA12*, *qacE*, *sitABCD*, *sul1*, *sul2*. Dos genes

blaCTX-M-2, e *blaCTX-M-55*, *blaCTX-M-8*, *sitABCD* e o ceftiofur. Os genes de resistência *lnu(F)*, *qnrB19*, *sul2* e o ácido nalidíxico. Entre os genes *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-8*, *sitABCD*. Entre os genes de resistência *aac(3)-IId*, *aac(3)-VIa*, *qacE*, *sull* e gentamicina e entre os genes *aph(3')-Ia*, *blaCTX-M-1*, *blaTEM-106*, *lnu(A)*, *mph(B)*, *sull*.

5.10 Genes de resistência mediados por bacteriófagos

O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos tem superado o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, atualmente existe um número limitado de antibióticos disponíveis sem resistência (ISKANDAR *et al.*, 2022). Medidas como o uso prudente de antibióticos, o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias, a melhoria das práticas de higiene e a vigilância epidemiológica são importantes visando mitigar os efeitos da resistência ao antimicrobianos, assim como a compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos no processo de resistência.

Em conjunto com os mecanismos de mutação, deriva genética, seleção natural e dispersão, a transferência horizontal de genes (HGT) constitui um componente fundamental da evolução bacteriana (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022). Por meio de mecanismos como transformação, conjugação ou transdução, a HGT é um dos principais meios de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (BORODOVICH *et al.*, 2022). Os bacteriófagos são vetores altamente eficazes na aquisição e disseminação de genes de resistência a antibióticos (ARGs) (COLOMER-LLUCH; JOFRE; MUNIESA, 2011).

Embora a transferência de genes de resistência possa ocorrer por meio de mecanismos como a transdução específica, é principalmente por meio da transdução generalizada que esse processo ocorre. Nesse mecanismo, os fagos infectam as bactérias e incorporam fragmentos de DNA bacteriano em seu capsídeo. Esses fragmentos podem incluir genes de resistência a antibióticos presentes na bactéria hospedeira. Quando o fago infecta outras bactérias, os fragmentos de DNA bacteriano contendo ARGs podem ser transferidos para as novas bactérias, disseminando a resistência (BLANCO-PICAZO *et al.*, 2022; COLOMER-LLUCH; JOFRE; MUNIESA, 2011; PFEIFER; BONNIN; ROCHA, 2022).

Estudos anteriores descreveram a presença de genes de resistência das classes descritas anteriormente no genoma de bacteriófagos obtidos de diferentes matrizes como esgoto, estações de tratamento de efluentes, no meio ambiente, produtos de origem animal (carnes suínas, bovinas e de frango), fezes suínas, fezes de frango e de compostagem. Foram detectados genes de resistência à aminoglicosídeos (*aac(6')-Im*, *aac-(Ib)-cr*, *aac(3)-Via*, *aphA1*, *aadA2*, *aph(3')-*

Ila, *ant(6)-Ia*, *aph(2'')-Ig*, *aph(3')-III*), à betalactâmicos (*blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-164*, *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-55*, *blaCTX-M-8*, *blaSHV-12*, *blaSHV-187*, *blaTEM-106*, *blaTEM-141*, *blaTEM-1A* e *blaTEM-1B*), a sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) e a tetraciclina (*tet(A)*) (ANAND *et al.*, 2016; BLANCO-PICAZO *et al.*, 2020; BLANCO-PICAZO *et al.*, 2022; COLOMER-LLUCH; JOFRE; MUNIESA, 2011; GÓMEZ-GÓMEZ *et al.*, 2019; PFEIFER; BONNIN; ROCHA, 2022; SHI *et al.*, 2023; SHOUSA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020; ZECHNER *et al.*, 2020).

Zankari *et al.* (2012) desenvolveram o ResFinder, uma ferramenta online que utiliza o BLAST para identificar genes de resistência à antimicrobianos adquiridos em dados de genoma completo. Um estudo desenvolvido por Kleinheinz; Joensen; Larsen (2014) utilizou o ResFinder para identificar genes adquiridos de resistência a antibióticos associados a *E. coli* em genomas de fagos coletados de bancos de dados públicos e de profagos previstos a partir de genomas bacterianos. O gene *catA1*, que pertence à classe dos fenóis, foi encontrado no genoma do fago, no atual estudo, 3,125% dos isolados de *E. coli* abrigavam o gene. No conjunto de profagos, 14 profagos previstos continham um total de 31 genes de resistência. Os genes identificados nos profagos foram *catA1*, *qacE*, *aaA5*, *mph(A)*, *sul1*, *dfrA17*, *blaTEM-1*, *qacE1* e *aph(3')-Ia*. No presente estudo, *catA1* foi detectado em 3,17% dos isolados, *blaTEM-1* (22,22%), *mph(A)* (1,58%), *qacE* (50,79%) e *sul1* (52,38%).

No presente estudo, foram identificados os genes de resistência a antimicrobianos *dfrA12*, *dfrA15*, *floR*, *qnrA* e *qnrS*. Estudos recentes têm demonstrado a presença destes genes no genoma de bacteriófagos (GÓMEZ-GÓMEZ *et al.*, 2019; MARTI; VARIATZA; BALCÁZAR, 2014; PFEIFER; BONNIN; ROCHA, 2022; SHOUSA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020).

Dentre os genes detectados, 27 foram descritos em estudos anteriores e associados a fagos, sendo eles *aac(3)-VIa*, *aph(3')-Ia*, *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-164*, *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-55*, *blaCTX-M-8*, *blaSHV-12*, *blaSHV-187*, *blaTEM-106*, *blaTEM-14*, *dfrA12*, *dfrA15*, *catA1*, *floR*, *mph(A)*, *qnrS1*, *sul1*, *tet(A)*, *tet(B)*, *qacE*. Tais genes foram detectados no genoma do fago Enterobacteria P7 (número de acesso AF503408) (KLEINHEINZ; JOENSEN; LARSEN, 2014), em fagos das famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (ANAND *et al.*, 2016; BLANCO-PICAZO *et al.*, 2020; COLOMER-LLUCH; JOFRE; MUNIESA, 2011) e família *Drexlerviridae* (BLANCO-PICAZO *et al.*, 2022). Kleinheinz; Joensen; Larsen (2014) identificou o gene *qacE* no profago (uid33411_0.8) de *Escherichia coli* IAI39, e os genes *catA1*, *blaTEM-1*, *mph(A)* e *sul1* e no profago (uid33415_0.1) de *Escherichia coli* UMN026.

Portanto, como evidenciado pelos estudos citados, bem como pelo presente trabalho, os bacteriófagos têm a capacidade de disseminar genes de resistência em diferentes ambientes. Conseqüentemente, as bactérias podem não apenas adquirir esses genes resistências, mas também de facilitar a transferência de genes entre diferentes espécies bacterianas, ampliando o cenário de aquisição de resistência.

Neste contexto, a resistência à antimicrobianos é uma questão mundial e ligada à Saúde Única, uma vez que envolve e interrelaciona com os três pilares fundamentais da abordagem: meio ambiente, saúde humana e saúde animal. Estratégias integradas, baseadas no conceito de Saúde Única e considerando os três domínios, apresentam-se como possíveis soluções no enfrentamento da resistência à antimicrobianos (ROBINSON *et al.*, 2016; RYU *et al.*, 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo identificou a prevalência de *Escherichia coli* patogênica aviária em 58% dos lotes de frangos de corte analisados, considerando as regiões produtoras de aves comerciais. Além disso, demonstrou-se uma ampla diversidade dos sorogrupos distribuídos pelo país.

A capacidade de formação de biofilmes é uma ferramenta importante para a virulência de diversas espécies bacterianas, pois fornece nutrientes e proteção contra dessecação, o sistema imunológico do hospedeiro, agentes antimicrobianos e desinfetantes. Entre os isolados testados, 71,43% demonstraram capacidade de formação de biofilmes.

Todos os isolados do estudo abrigavam ao menos um gene de virulência. Tais genes são relacionados a fatores de virulência que desempenham um papel importante na patogenicidade das cepas APEC. A maioria dos isolados continha genes relacionados à adesão, ao sistema de aquisição de ferro e ao fator de resistência ao soro, enquanto todos os isolados demonstraram a presença de genes relacionados à produção de toxinas.

A caracterização do perfil de resistência antimicrobiana revelou uma presença significativa de cepas multirresistentes não apenas aos antibióticos mais utilizados na produção animal, mas também aos antibióticos comumente empregados no tratamento de infecções em seres humanos.

Os resultados demonstram a prevalência de genes de resistência a antimicrobianos de diferentes classes de antibióticos e desinfetantes, destacando o papel dos bacteriófagos na disseminação desses genes de resistência na indústria avícola. Este foi o primeiro estudo brasileiro revelando o papel dos bacteriófagos nas resistências a antimicrobianos em APEC.

O estudo destaca um alerta, não apenas para a saúde animal e humana, mas também no contexto da abordagem de Saúde Única, evidenciando a importância de ampliar os estudos relacionados a resistência a antimicrobianos, considerando a interação entre bactérias infectadas por bacteriófagos e a relação parasita-hospedeiro frente aos estudos de eficiência antimicrobiana. Assim como a vigilância, que desempenha um papel crítico na avaliação da eficácia das intervenções adotadas para enfrentar este desafio, bem como na investigação desses eventos, visando a identificação e prevenção da resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABPA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL). **RELATÓRIO ANUAL 2023**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2023.
- AFAYIBO, D. J. A.; ZHU, H.; ZHANG, B.; YAO, L.; ABDELGAWAD, H. A.; TIAN, M.; QI, J.; LIU, Y.; WANG, S. Isolation, Molecular Characterization, and Antibiotic Resistance of Avian Pathogenic Escherichia coli in Eastern China. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/9/7/319>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- ANAND, T.; BERA, B. Ch.; VAID, R. K.; BARUA, S.; RIYESH, T.; VIRMANI, N.; HUSSAIN, M.; SINGH, R. K.; TRIPATHI, B. N. Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3458–3466, 16 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000639>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- ARNOLD, B. J.; HUANG, I.-T.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 206–218, 12 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-021-00650-4>>. Acesso em: 30 set. 2023.
- ARNS, C. W.; ZUANAZE, M. Metapneumovírus Aviário. *Em*: ANGELO BERCHIERI JÚNIOR; EDIR NEPOMUCENO SILVA; JOSÉ DI FÁBIO; LUIZ SESTI; MARCELO ALEXANDRE FAGNANI ZUANAZE. **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 777–783.
- ASWANI, V. H.; SHUKLA, S. K. An Early History of Phage Therapy in the United States: Is it Time to Reconsider? **Clinical Medicine & Research**, v. 19, n. 2, p. 82–89, 25 jun. 2021. Disponível em: <<http://www.clinmedres.org/content/19/2/82.full>>. Acesso em: 31 maio. 2023.
- AWAD, A. M.; EL-SHALL, N. A.; KHALIL, D. S.; EL-HACK, M. E. A.; SWELUM, A. A.; MAHMOUD, A. H.; EBAID, H.; KOMANY, A.; SAMMOUR, R. H.; SEDEIK, M. E. Incidence, Pathotyping, and Antibiotic Susceptibility of Avian Pathogenic Escherichia coli among Diseased Broiler Chicks. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 114, 12 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/2/114>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- AZAM, M.; MOHSIN, M.; JOHNSON, T. J.; SMITH, E. A.; JOHNSON, A.; UMAIR, M.; SALEEMI, M. K.; SAJJAD-UR-RAHMAN. Genomic landscape of multi-drug resistant avian pathogenic Escherichia coli recovered from broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 247, 1 ago.

2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113520300791?via%3Dihub>>.
- Acesso em: 14 dez. 2022.
- BARBIERI, N. L.; ALD, O.; TEJKOWSKI, T. M.; PAVANELO, D. B.; ROCHA, D. A. Genotypes and Pathogenicity of Cellulitis Isolates Reveal Traits That Modulate APEC Virulence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 72322, 2013. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- BARROS, M. R.; DA SILVEIRA, W. D.; DE ARAÚJO, J. M.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, A. A. da F.; SANTOS, A. P. da S. F.; SILVA, V. A. S.; MOTA, R. A. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 405–410, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/pvb/a/bMLk58RScKKCXdTxyzVDGYN/?lang=pt>>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1 abr. 1966. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/45/4/493/4821085>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 165, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0569-5>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- BERMUDEZ, A. J.; STEWART-BROWN, B. Disease prevention and diagnostic. *Em*: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, , 2003. p. 17–55.
- BLANCO-PICAZO, P.; FERNÁNDEZ-ORTH, D.; BROWN-JAQUE, M.; MIRÓ, E.; ESPINAL, P.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MUNIESA, M.; NAVARRO, F. Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6737, 21 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-63432-7>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- BLANCO-PICAZO, P.; GÓMEZ-GÓMEZ, C.; AGUILÓ-CASTILLO, S.; FERNÁNDEZ-ORTH, D.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; MUNIESA, M.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L. Chicken liver is a potential reservoir of bacteriophages and phage-derived particles containing antibiotic resistance genes. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 2464–2475, 29 set. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-022-01338-0>>. Acesso em: 31 mar. 2023.

BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**, v. 4, 25 mar. 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/05826>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

BONATTO, G.; DE AVILA, V. S.; DE BRITO, K. C. T.; DE BRITO, B. G.; KRABBE, E. L. **Fatores de risco relacionados com as perdas por celulite em frango de corte.**

BORODOVICH, T.; SHKOPOROV, A. N.; ROSS, R. P.; HILL, C. Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. **Gastroenterology Report**, v. 10, 25 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9006064/#goac012-B6>>. Acesso em: 29 set. 2023.

BRUNEL, J. Antibiosis from Pasteur to Fleming. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. VI, n. Summer, p. 287–301, 1951. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/24619870>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

BRÜSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W.-D. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 560–602, set. 2004. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mubr.68.3.560-602.2004>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J.; RD, B. Ionophores: Their Use as Ruminant Growth Promotants and Impact on Food Safety. **Ionophores Impact on Food Safety 43 Curr. Issues Intest. Microbiol**, v. 4, p. 43–51, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14503688/>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

CANCHAYA, C.; FOURNOUS, G.; CHIBANI-CHENNOUFI, S.; DILLMANN, M.-L.; BRÜSSOW, H. Phage as agents of lateral gene transfer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 417–424, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403000869?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

CARDOSO, A.; TESSARI, E.; LUCIANO, R. Resistência antimicrobiana de *Escherichia Coli* isolada de aves comerciais. **O Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1–8, 2019. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/V81_1/50904347-3135-4e92-9c37-df45ff7e797f.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2023.

CASALINO, G.; DINARDO, F. R.; D'AMICO, F.; BOZZO, G.; BOVE, A.; CAMARDA, A.; LOMBARDI, R.; DIMUCCIO, M. M.; CIRCELLA, E. Antimicrobial Efficacy of Cinnamon Essential Oil against Avian Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry. **Animals**, v. 13, n. 16, p.

- 2639, 16 ago. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10451300/>>. Acesso em: 30 set. 2023.
- CEPEA (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA). **PIB do agronegócio** 2022/2023. Disponível em: <[https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRONEGOCIO-2022.17MAR2023\(1\).pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRONEGOCIO-2022.17MAR2023(1).pdf)>. Acesso em: 31 maio. 2023.
- CHEN, B.; HAN, J.; DAI, H.; JIA, P. Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117074, ago. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121006564?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 maio. 2023.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, out. 2000. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>>. Acesso em: 29 maio. 2023.
- CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12019>>. Acesso em: 29 maio. 2023.
- CLERMONT, O.; DIXIT, O. V. A.; VANGCHHIA, B.; CONDAMINE, B.; DION, S.; BRIDIER-NAHMIA, A.; DENAMUR, E.; GORDON, D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 3107–3117, 28 ago. 2019. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.14713>>. Acesso em: 29 maio. 2023.
- CLOKIE, M. R. J.; MILLARD, A. D.; LETAROV, A. V.; HEAPHY, S. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 22 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/bact.1.1.14942>>. Acesso em: 4 maio. 2023.
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**, 2023a..

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2023b..

COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 4, p. 587–589, 15 fev. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/4/587/2748163>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

COLLETT, S. R.; SMITH, J. A.; BOULIANNE, M.; OWEN, R. L.; GINGERICH, E.; SINGER, R. S.; JOHNSON, T. J.; HOFACRE, C. L.; BERGHAUS, R. D.; STEWART-BROWN, B. Principles of Disease Prevention, Diagnosis, and Control. *Em*: SWAYNE, D. E.; BOULIANNE, M.; LOGUE, C. M.; MCDUGALD, L. R.; NAIR, V.; SUAREZ, D. L. **Diseases of Poultry**. 14. ed. NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2020. p. 1–78.

COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17549, 3 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048399/>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 7 jan. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2265>>. Acesso em: 13 dez. 2022.

CYOIA, P. S.; KOGA, V. L.; NISHIO, E. K.; HOULE, S.; DOZOIS, C. M.; DE BRITO, K. C. T.; DE BRITO, B. G.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Distribution of ExPEC virulence factors, blaCTX-M, fosA3, and mcr-1 in Escherichia coli isolated from commercialized chicken carcasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03254/full>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

DAVIES, Y. M.; FRANCO, L. S.; BARBOSA, F. B.; VANIN, C. L.; GOMES, V. T. M.; MORENO, L. Z.; BARBOSA, M. R. F.; SATO, M. I. Z.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. Use of MALDI-TOF for identification and surveillance of gram-negative bacteria in captive wild psittacines. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjb/a/JkYfSHGJGtQZcTDsmTQhNRL/?lang=en>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

DE BIASE, D.; TRAMONTI, A.; BOSSA, F.; VISCA, P. The response to stationary-phase stress conditions in Escherichia coli : role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1198–1211, jun. 1999. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.1999.01430.x>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

DE CARLI, S.; IKUTA, N.; LEHMANN, F. K. M.; DA SILVEIRA, V. P.; DE MELO PREDEBON, G.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2635–2640, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119322783?via%3Dihub>>.

Acesso em: 14 dez. 2022.

DE OLIVEIRA, A. L.; NEWMAN, D. M.; SATO, Y.; NOEL, A.; RAUK, B.; NOLAN, L. K.; BARBIERI, N. L.; LOGUE, C. M. Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Associated With Turkey Cellulitis in Iowa. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 3 jul. 2020. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00380/full>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary research**, v. 30, n. 2–3, p. 299–316, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10367360/>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, set. 2002.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 355–366, 14 ago. 2008. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450802216652>>. Acesso em: 28 jun. 2023.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY); ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. **EFSA Journal**, v. 20, n. 3, mar. 2022. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2022.7209>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

ELOIS, M. A.; SILVA, R. da; PILATI, G. V. T.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Bacteriophages as Biotechnological Tools. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 349, 26 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/15/2/349>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

FAN, S.; FOSTER, D.; MILLER, W. G.; OSBORNE, J.; KATHARIOU, S. Impact of Ceftiofur Administration in Steers on the Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 318, 4 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/318>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. K. Colibacilose. *Em*: ANGELO BERCHIERI JÚNIOR; EDIR NEPOMUCENO SILVA; JOSÉ DI FÁBIO; LUIZ SESTI; MARCELO ALEXANDRE FAGNANI ZUANAZE. **Doenças das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 667–692.

FLEMING, A. ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZÆ. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2 set. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2415>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

FRATAMICO, P. M.; DEBROY, C.; LIU, Y.; NEEDLEMAN, D. S.; BARANZONI, G. M.; FENG, P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*†. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 3 maio 2016. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01384-13>>. Acesso em: 29 maio. 2023.

GAMBI, L.; CRIPPA, C.; LUCCHI, A.; DE CESARE, A.; PARISI, A.; MANFREDA, G.; PASQUALI, F. The resistome of commensal *Escherichia coli* isolated from broiler carcasses “produced without the use of antibiotics”a. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, 1 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257912200075X?via%3Dihub>>.

Acesso em: 14 dez. 2022.

GÓMEZ-GÓMEZ, C.; BLANCO-PICAZO, P.; BROWN-JAQUE, M.; QUIRÓS, P.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; CERDÀ-CUELLAR, M.; MUNIESA, M. Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13281, 16 set. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-49898-0>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

GRAKH, K.; MITTAL, D.; PRAKASH, A.; JINDAL, N. Characterization and antimicrobial susceptibility of biofilm-producing Avian Pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens and their environment in India. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 2, p. 537–

548, 3 jun. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-021-09881-5#article-info>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/29/8/1072/228832>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; CAMPOS, W. F.; DEL FIOL, F. S.; VILA, M.; DAŁBROWSKA, K.; KRYLOV, V. N.; BALCÃO, V. M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 38–58, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318301332?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

HOBBS, Z.; ABEDON, S. T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 7, p. fnw047, abr. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/363/7/fnw047/2197796?login=false>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

HOEPERS, P. **Caracterização de Escherichia coli isoladas de perus**. 2016. Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 272–275, abr. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12686>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

HOU, C. Y.; AHN, C.; CHO, B.-K.; KANG, T. J. Selection of Escherichia coli Glutamate Decarboxylase Active at Neutral pH from a Focused Library. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 4, p. 473–479, 13 ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12257-018-0258-9>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, out. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

IBRAHIM, R. A.; CRYER, T. L.; LAFI, S. Q.; BASHA, E. A.; GOOD, L.; TARAIZI, Y. H. Identification of Escherichia coli from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 22 maio 2019a. Disponível em:

<<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1901-1>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

IBRAHIM, W. A.; MAROUF, S. A.; ERFAN, A. M.; NASEF, S. A.; EL JAKEE, J. K. The occurrence of disinfectant and antibiotic-resistant genes in *Escherichia coli* isolated from chickens in Egypt. **Veterinary World**, v. 12, n. 1, p. 141, 2019b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431804/>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

ISKANDAR, K.; MURUGAIYAN, J.; HAMMOUDI HALAT, D.; HAGE, S. El; CHIBABHAI, V.; ADUKKADUKKAM, S.; ROQUES, C.; MOLINIER, L.; SALAMEH, P.; VAN DONGEN, M. Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 182, 30 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8868473/>>. Acesso em: 30 set. 2023.

ITZEK, A.; ZHENG, L.; CHEN, Z.; MERRITT, J.; KRETH, J. Hydrogen Peroxide-Dependent DNA Release and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in *Streptococcus gordonii*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 24, p. 6912–6922, 15 dez. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jb.05791-11?src=getftr>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISHI, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 354–358, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/sTxSsTsZN9nWKwPtHVX3yhTk/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

JIANG, X.; XU, Y.; LI, Y.; ZHANG, K.; LIU, L.; WANG, H.; TIAN, J.; YING, H.; SHI, L.; YU, T. Characterization and horizontal transfer of *qacH* -associated class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from retail meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 258, p. 12–17, out. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517303069?via%3Dihub>>.

Acesso em: 30 maio. 2023.

JOHNSON, T. J.; MILLER, E. A.; FLORES-FIGUEROA, C.; MUNOZ-AGUAYO, J.; CARDONA, C.; FRANSEN, K.; LIGHTY, M.; GONDER, E.; NEZWORSKI, J.; HAAG, A.; BEHL, M.; KROMM, M.; WILEMAN, B.; STUDNISKI, M.; SINGER, R. S. Refining the definition of the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype through inclusion of high-risk clonal groups. **Poultry Science**, v. 101, n. 10, 1 out. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579122003005?via%3Dihub>>.

Acesso em: 14 dez. 2022.

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745–758, 15 jan. 2006. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.188.2.745-758.2006>>. Acesso em: 4 abr. 2023.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. 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, dez. 2008. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jcm>>. Acesso em: 14 dez. 2023.

JONARE, L.; ÖSTLUND, E.; SÖDERLUND, R.; HANSSON, I.; ASPÁN, A.; JANSSON, D. S. Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) confirms systemic spread of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in broilers with cellulitis. **Veterinary Microbiology**, v. 282, p. 109755, jul. 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113523001074?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

KAMPF, G. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. **Antibiotics**, v. 7, n. 4, p. 110, 14 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/7/4/110>>. Acesso em: 29 maio. 2023.

KATHAYAT, D.; LOKESH, D.; RANJIT, S.; RAJASHEKARA, G. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 467, 12 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/4/467>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

KHAFAGY, A.; EID, S.; MOHAMMED, R. Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chicken. **Suez Canal Veterinary Medicine Journal. SCVMJ**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 30 jun. 2019. Disponível em: <https://scvmj.journals.ekb.eg/article_66688_a6b24bd5c9e341bd5f5daa7a5b4325f9.pdf>. Acesso em: 30 set. 2023.

KHATOON, Z.; MCTIERNAN, C. D.; SUURONEN, E. J.; MAH, T.-F.; ALARCON, E. I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. e01067, dez. 2018. Disponível em: <[https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(18\)36901-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844018369019%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(18)36901-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844018369019%3Fshowall%3Dtrue)>. Acesso em: 24 jun. 2023.

KIM, Y. Bin; YOON, M. Y.; HA, J. S.; SEO, K. W.; NOH, E. B.; SON, S. H.; LEE, Y. J. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 1088–1095, fev. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119491670?via%3Dihub>>.

Acesso em: 14 dez. 2022.

KLEINHEINZ, K. A.; JOENSEN, K. G.; LARSEN, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. **Bacteriophage**, v. 4, n. 2, p. e27943, 22 abr. 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/bact.27943>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

KOLENDA, R.; SIDORCZUK, K.; NOSZKA, M.; ALEKSANDROWICZ, A.; KHAN, M. M.; BURDUKIEWICZ, M.; PICKARD, D.; SCHIERACK, P. Genome placement of alpha-haemolysin cluster is associated with alpha-haemolysin sequence variation, adhesin and iron acquisition factor profile of *Escherichia coli*. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 12, 23 dez. 2021.

Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000743>>.

Acesso em: 24 jun. 2023.

KORB, A.; DE NAZARENO, E. R.; COSTA, L. D.; NOGUEIRA, K. da S.; DALSENTER, P. R.; TUON, F. F. B.; POMBA, M. C. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 258–264, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/WRf8mxQMGgBPBBDzCRzsp6D/?lang=pt#>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

KRIZMAN, M.; AVGUSTIN, J. A.; ZDOVC, I.; GOLOB, M.; TRKOV, M.; CIGLENECKI, U. J.; BIASIZZO, M.; KIRBIS, A. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases and Other *Escherichia coli* Isolated from Food of Animal Origin and Human Intestinal Isolates. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 1, p. 113–120, 1 jan. 2017.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22093747?via%3Dihub>>.

Acesso em: 27 jan. 2023.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 9–27, jun. 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160598000609?via%3Dihub>>.

Acesso em: 24 jun. 2023.

- KÜMMERLE, N.; FEUCHT, H. H.; KAULFERS, P. M. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2276–2279, out. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163518/>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 27–35, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528802000759?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J. G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 813–823, 18 abr. 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-010-2468-8>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 21–27, jul. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315001586?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, dez. 2013. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70318-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70318-9/fulltext)>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- LEGNARDI, M.; ALLÉE, C.; FRANZO, G.; CECCHINATO, M.; BROWN, P. Research Note: Detection of Avian metapneumovirus subgroup C specific antibodies in a mallard flock in Italy. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101186, jul. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121002200?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- LI, T.; CASTAÑEDA, C. D.; MIOTTO, J.; MCDANIEL, C.; KIESS, A. S.; ZHANG, L. Effects of in ovo probiotic administration on the incidence of avian pathogenic *Escherichia coli* in broilers and an evaluation on its virulence and antimicrobial resistance properties. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100903, 1 mar. 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120309548?via%3Dihub>>.

Acesso em: 27 jan. 2023.

LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Aerobactin Synthesis Genes *iucA* and *iucC* Contribute to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57794, 27 fev. 2013.

Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057794>>.

Acesso em: 4 abr. 2023.

LOZICA, L.; VILLUMSEN, K. R.; LI, G.; HU, X.; MALJKOVIĆ, M. M.; GOTTSTEIN, Ž. Genomic Analysis of *Escherichia coli* Longitudinally Isolated from Broiler Breeder Flocks after the Application of an Autogenous Vaccine. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 377, 6 fev. 2022.

Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/2/377>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 622–628, out. 2017. Disponível em: <[https://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039\(17\)30188-3/fulltext](https://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039(17)30188-3/fulltext)>. Acesso em: 24 jun. 2023.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 561–588, 1 out. 2006. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Acesso em: 24 maio. 2023.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, 17 mar. 1998. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.95.6.3140>>. Acesso em: 24 maio. 2023.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, out. 2011. Disponível em: <Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health>. Acesso em: 3 jun. 2023.

MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCÁZAR, J. L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. O456–O459, jul. 2014. Disponível em:

<[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61174-5/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61174-5/fulltext)>. Acesso em: 30 jun. 2023.

MATTHIJS, M. G. R.; ARIAANS, M. P.; DWARS, R. M.; VAN ECK, J. H. H.; BOUMA, A.; STEGEMAN, A.; VERVELDE, L. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1–2, p. 77–84, jan. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708003619?via%3Dihub>>.

Acesso em: 24 jun. 2023.

MC CARLIE, S.; BOUCHER, C. E.; BRAGG, R. R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 48, p. 100672, jan. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136876461930069X?via%3Dihub>>.

Acesso em: 24 maio. 2023.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. 3rd. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.

MEHAT, J. W.; VAN VLIET, A. H. M.; LA RAGIONE, R. M. The Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype is comprised of multiple distinct, independent genotypes. **Avian Pathology**, v. 50, n. 5, p. 402–416, 3 set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1915960>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A. de; STEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. D. da. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/XBmLq75dfDWVjbdYDz6DTgz/?lang=en>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

NEWMAN, D. M.; BARBIERI, N. L.; DE OLIVEIRA, A. L.; WILLIS, D.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from colibacillosis cases, 2018. **PeerJ**, v. 9, p. e11025, 4 mar. 2021. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/11025/>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

NGUYEN, T. T. H.; KIKUCHI, T.; TOKUNAGA, T.; IYODA, S.; IGUCHI, A. Diversity of the Tellurite Resistance Gene Operon in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 28 maio 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.681175/full>>. Acesso em: 14 jun. 2023.

NIELSEN, D. W.; KLIMAVICZ, J. S.; CAVENDER, T.; WANNEMUEHLER, Y.; BARBIERI, N. L.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. The Impact of Media, Phylogenetic Classification, and *E. coli* Pathotypes on Biofilm Formation in Extraintestinal and Commensal *E. coli* From Humans and Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 8 maio 2018. Disponível

em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00902/full>>. Acesso em: 19 jun. 2023.

NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J.; BARBIERI, N. L.; LOGUE, C. M. Colibacillosis. *Em: SWAYNE, D. E.; BOULIANNE, M.; LOGUE, C. M.; MCDUGALD, L. R.; NAIR, V.; SUAREZ, D. L. Diseases of Poultry*. 14. ed. NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2020. p. 770–830. OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1919–1927, jun. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/106/6/1919/6719746?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 3, p. 667–710, set. 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/br.41.3.667-710.1977>>. Acesso em: 29 maio. 2023.

OVI, F.; ZHANG, L.; NABORS, H.; JIA, L.; ADHIKARI, P. A compilation of virulence-associated genes that are frequently reported in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) compared to other *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 134, n. 3, 1 mar. 2023. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article/134/3/lxad014/7031757>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

PAIVA, J. B. de; LEITE, J. L.; SILVA, L. P. M. da; ROJAS, T. C. G.; DE PACE, F.; CONCEIÇÃO, R. A.; SPERANDIO, V.; SILVEIRA, W. D. da. Influence of the major nitrite transporter NirC on the virulence of a Swollen Head Syndrome Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) strain. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 123–131, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514005392?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

PALMA, E.; TILOCCA, B.; RONCADA, P. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1914, 11 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/1914>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087–5096, set. 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.71.9.5087-5096.2003>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

PAVLICKOVA, S.; KLANCNIK, A.; DOLEZALOVA, M.; MOZINA, S. S.; HOLKO, I. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains

- isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 8, p. 570–576, 3 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2017.1318637?journalCode=lesb20>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- PFEIFER, E.; BONNIN, R. A.; ROCHA, E. P. C. Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. **mBio**, v. 13, n. 5, 26 out. 2022. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01851-22>>. Acesso em: 31 mar. 2023.
- PITOUT, J. D. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 657–669, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18847404/>>. Acesso em: 27 jan. 2023.
- RABELLO, R. F.; BONELLI, R. R.; PENNA, B. A.; ALBUQUERQUE, J. P.; SOUZA, R. M.; CERQUEIRA, A. M. F. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 552, 26 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/552>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- RACEWICZ, P.; MAJEWSKI, M.; BIESIADA, H.; NOWACZEWSKI, S.; WILCZYŃSKI, J.; WYSTALSKA, D.; KUBIAK, M.; PSZCZOŁA, M.; MADEJA, Z. E. Prevalence and characterisation of antimicrobial resistance genes and class 1 and 2 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolated from poultry production. 2022. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018. Disponível em: <<http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2018.3.482>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; OLIVER GLÖCKNER, F.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 15 mar. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939971/>>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- ROBINSON, T. P.; BU, D. P.; CARRIQUE-MAS, J.; FÈVRE, E. M.; GILBERT, M.; GRACE, D.; HAY, S. I.; JIWAKANON, J.; KAKKAR, M.; KARIUKI, S.; LAXMINARAYAN, R.; LUBROTH, J.; MAGNUSSON, U.; THI NGOC, P.; VAN BOECKEL, T. P.; WOOLHOUSE, M. E. J. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 377–380, jul. 2016.
- RODRIGUES, S. V.; LAVINIKI, V.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C. T. P. Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity. **Current Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 194–199, 4

fev. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-018-1608-8#article-info>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Vet. Res**, v. 36, p. 241–256, 2005. Disponível em: <<https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2005/02/v4044.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

ROEDEL, A.; VINCZE, S.; PROJAHN, M.; ROESLER, U.; ROBÉ, C.; HAMMERL, J. A.; NOLL, M.; AL DAHOUK, S.; DIECKMANN, R. Genetic but No Phenotypic Associations between Biocide Tolerance and Antibiotic Resistance in Escherichia coli from German Broiler Fattening Farms. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 651, 21 mar. 2021.

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; DA SILVA, R.; DE SOUZA, E. B.; BONATTO, C.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 30 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.793135/full>>. Acesso em: 4 maio. 2023.

ROTH, N.; KÄSBOHRER, A.; MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; HOFACRE, C.; DOMIG, K. J. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. **Poultry Science**, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, abr. 2019.

ROZMAN, U.; PUŠNIK, M.; KMETEC, S.; DUH, D.; ŠOSTAR TURK, S. Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2550, 10 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/12/2550>>. Acesso em: 30 maio. 2023.

RUAN, X.; DENG, X.; TAN, M.; WANG, Y.; HU, J.; SUN, Y.; YU, C.; ZHANG, M.; JIANG, N.; JIANG, R. Effect of resveratrol on the biofilm formation and physiological properties of avian pathogenic Escherichia coli. **Journal of Proteomics**, v. 249, p. 104357, out. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391921002566?via%3Dihub>>.

Acesso em: 30 jun. 2023.

RYU, S.; KIM, B. I.; LIM, J.-S.; TAN, C. S.; CHUN, B. C. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 50, n. 6, p. 411–414, 30 nov. 2017.

SABRI, M.; LÉVEILLÉ, S.; DOZOIS, C. M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic Escherichia coli strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745–758, 1 mar. 2006. Disponível em:

<<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28682-0>>.

Acesso em: 30 jun. 2023.

SAIF, Y. M.; SWAYNE, D. E.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; JOHNSON, T. J.; DAY, J. M.; FRENCH, D.; GINGERICH, E.; BILGILI, S. F.; JONES, K.; BOGGAN, G.; MARKIS, M. Emerging Diseases and Diseases of Complex or Unknown Etiology. *Em: Diseases of Poultry*. [s.l.] Wiley, 2020. p. 1383–1410.

SAMY, A.; NAGUIB, M. Avian Respiratory Coinfection and Impact on Avian Influenza Pathogenicity in Domestic Poultry: Field and Experimental Findings. *Veterinary Sciences*, v. 5, n. 1, p. 23, 24 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/5/1/23>>. Acesso em: 31 maio. 2023.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 32, n. 3, p. 188–217, maio 2013. Disponível em: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.21359>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

SATPATHY, S.; SEN, S. K.; PATTANAIK, S.; RAUT, S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 56–66, jul. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818116300937?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 10, p. 608–620, 3 out. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-022-00767-0>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

SCHNEIDER, C. L. Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction. *Em: Bacteriophages*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 151–192.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/14/2068/2390517>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical*

- Infectious Diseases**, v. 49, n. 4, p. 543–551, 15 ago. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/49/4/543/380250>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDOLA, D.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309–319, ago. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/121/2/309/6717028?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- SHI, M.; ZHAO, Z.; WANG, X.; LI, H.; GU, J.; SONG, Z.; HU, T.; SUN, Y.; WANG, H. Profiles and key drivers of bacteria/phage co-mediated antibiotic resistance genes during swine manure composting amended with humic acid. **Bioresource Technology**, v. 374, p. 128721, abr. 2023.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, p. 407–413, set. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224409000557?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- SHOUSA, A.; AWAIWANONT, N.; SOFKA, D.; SMULDERS, F. J. M.; PAULSEN, P.; SZOSTAK, M. P.; HUMPHREY, T.; HILBERT, F. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4600–4606, 15 jul. 2015. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00872-15>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- SIMMONDS, P.; AIEWSAKUN, P. Virus classification – where do you draw the line? **Archives of Virology**, v. 163, n. 8, p. 2037–2046, 24 ago. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-018-3938-z>>. Acesso em: 6 maio. 2023.
- SKYBERG, J. A.; SIEK, K. E.; DOETKOTT, C.; NOLAN, L. K. Biofilm formation by avian Escherichia coli in relation to media, source and phylogeny. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, fev. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/102/2/548/6718762?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 19 jun. 2023.
- SMITH, W. H.; COOK, J. K. A.; PARSELL, Z. E. The Experimental Infection of Chickens with Mixtures of Infectious Bronchitis Virus and Escherichia coli. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 4, p. 777–786, 1 abr. 1985. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-66-4-777>>. Acesso em: 31 maio. 2023.
- SORA, V. M.; MERONI, G.; MARTINO, P. A.; SOGGIU, A.; BONIZZI, L.; ZECCONI, A. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Virulence Factors and Antibiotic Resistance.

- Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1355, 20 out. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8618662/>>. Acesso em: 29 maio. 2023.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, abr. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701200001226?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 maio. 2023.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, out. 2002. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- SUAREZ, D. L.; MILLER, P. J.; KOCH, G.; MUNDT, E.; RAUTENSCHLEIN, S. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. *Em: Diseases of Poultry*. [s.l.] Wiley, 2020. p. 109–166.
- SUBEDI, M.; LUITEL, H.; DEVKOTA, B.; BHATTARAI, R. K.; PHUYAL, S.; PANTHI, P.; SHRESTHA, A.; CHAUDHARY, D. K. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 27 mar. 2018. Disponível em: <<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1442-z>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- THOMRONGSUWANNAKIJ, T.; NARINTHORN, R.; MAHAWAN, T.; BLACKALL, P. J. Molecular and phenotypic characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from commercial broilers and native chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 1, p. 101527, 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121005496?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 jan. 2023.
- TOFANI, S.; ALBINI, E.; BLASI, F.; CUCCO, L.; LOVITO, C.; MARESCA, C.; PESCIAROLI, M.; ORSINI, S.; SCOCCIA, E.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C. F.; MASSACCI, F. R. Assessing the Load, Virulence and Antibiotic-Resistant Traits of ESBL/Ampc *E. coli* from Broilers Raised on Conventional, Antibiotic-Free, and Organic Farms. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1484, 26 out. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/11/11/1484>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

- TONG, C.; HU, H.; CHEN, G.; LI, Z.; LI, A.; ZHANG, J. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. **Environmental Research**, v. 195, p. 110897, abr. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935121001912?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 maio. 2023.
- TORRES-BARCELÓ, C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0169-z>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- VAN DUIJKEREN, E.; SCHWARZ, C.; BOUCHARD, D.; CATRY, B.; POMBA, C.; BAPTISTE, K. E.; MORENO, M. A.; RANTALA, M.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; WESTER, A. L.; IGNATE, K.; KUNSAGI, Z.; JUKES, H. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 9, p. 2480–2496, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>>. Acesso em: 1 abr. 2023.
- WAGNER, R. D.; JOHNSON, S. J.; CERNIGLIA, C. E.; ERICKSON, B. D. Bovine Intestinal Bacteria Inactivate and Degrade Ceftiofur and Ceftriaxone with Multiple β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4990–4998, nov. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00008-11>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- WANG, M.; LIU, P.; ZHOU, Q.; TAO, W.; SUN, Y.; ZENG, Z. Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 291–298, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117349187?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- WANG, Y.; TANG, C.; YU, X.; XIA, M.; YUE, H. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 4, p. 297–302, 11 ago. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2010.495742>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- WILCZYŃSKI, J.; STEPIEŃ-PYŚNIAK, D.; WYSTALSKA, D.; WERNICKI, A. Molecular and Serological Characteristics of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Various Clinical Cases of Poultry Colibacillosis in Poland. **Animals**, v. 12, n. 9, 1 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/12/9/1090>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

WILSON, K. Preparation of Genomic <sc>DNA</sc> from Bacteria. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 56, n. 1, 15 out. 2001. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb0204s56>>.

Acesso em: 30 jun. 2023.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals**. [s.l: s.n.]. . Acesso em: 3 fev. 2023.

XIA, F.; CHENG, J.; JIANG, M.; WANG, Z.; WEN, Z.; WANG, M.; REN, J.; ZHUGE, X. Genomics Analysis to Identify Multiple Genetic Determinants That Drive the Global Transmission of the Pandemic ST95 Lineage of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1489, 7 dez. 2022.

YANG, Y.; XIE, X.; TANG, M.; LIU, J.; TUO, H.; GU, J.; TANG, Y.; LEI, C.; WANG, H.; ZHANG, A. Exploring the profile of antimicrobial resistance genes harboring by bacteriophage in chicken feces. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 134446, jan. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719344377?via%3Dihub>>.

Acesso em: 30 jun. 2023.

YU, D.; BANTING, G.; NEUMANN, N. F. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 553–571, ago. 2021. Disponível em: <<https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjm-2020-0508#sec-4>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S.; VESTERGAARD, M.; RASMUSSEN, S.; LUND, O.; AARESTRUP, F. M.; LARSEN, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640–2644, 1 nov. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/67/11/2640/707208>>. Acesso em: 13 dez. 2022.

ZECHNER, V.; SOFKA, D.; PAULSEN, P.; HILBERT, F. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* and Resistance Genes in Coliphages from a Small Animal Clinic and in a Patient Dog with Chronic Urinary Tract Infection. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 652, 29 set. 2020. Disponível em: <[10.3390/antibiotics9100652](https://doi.org/10.3390/antibiotics9100652)>. Acesso em: 30 jun. 2023.

ZOU, L.; MENG, J.; MCDERMOTT, P. F.; WANG, F.; YANG, Q.; CAO, G.; HOFFMANN, M.; ZHAO, S. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2644–2649, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/69/10/2644/2911140>>.

Acesso em: 27 jan. 2023.

APÊNDICE A – RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO DE 63 ISOLADOS DE *E. COLI*

Amostra	Total de Scaffolds	Comprimento Total	Maior Scaffold	Conteúdo de GC	Melhor identificação	Total de Alinhamentos	Cobertura
1	222	5.270.087	329.295	50,6	<i>Escherichia coli</i>	4.004.026	75,98%
4	331	5.395.010	282.352	50,49	<i>Escherichia coli</i>	4.395.695	81,48%
5	140	5.248.759	276.751	50,52	<i>Escherichia coli</i>	4.470.200	85,17%
6	132	5.629.284	644.814	50,37	<i>Escherichia coli</i>	4.399.480	78,15%
7	269	5.381.592	223.932	50,44	<i>Escherichia coli</i>	4.195.668	77,96%
18	324	5.193.542	178.154	50,58	<i>Escherichia coli</i>	4.220.977	81,27%
19	161	4.984.352	357.384	50,67	<i>Escherichia coli</i>	4.449.173	89,26%
20	195	5.514.786	511.501	50,54	<i>Escherichia coli</i>	4.055.825	73,54%
23	215	5.592.920	323.179	50,54	<i>Escherichia coli</i>	4.111.447	73,51%
24	176	5.244.174	446.709	50,41	<i>Escherichia coli</i>	4.392.453	83,76%
26	222	5.136.410	198.216	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.206.165	81,89%
28	342	5.929.039	311.629	50,51	<i>Escherichia coli</i>	4.600.493	77,59%

29	187	5.104.577	402.160	50,6	<i>Escherichia coli</i>	4.158.767	81,47%
30	104	4.938.782	439.602	50,65	<i>Escherichia coli</i>	4.156.934	84,17%
31	221	5.316.148	312.767	50,69	<i>Escherichia coli</i>	4.019.589	75,61%
33	284	5.452.406	258.390	50,72	<i>Escherichia coli</i>	4.106.271	75,31%
35	102	4.825.726	325.603	50,38	<i>Escherichia coli</i>	4.135.077	85,69%
38	100	4.822.339	320.535	50,38	<i>Escherichia coli</i>	4.142.238	85,90%
39	113	4.818.139	281.284	50,71	<i>Escherichia coli</i>	4.387.911	91,07%
40	105	4.823.061	323.373	50,38	<i>Escherichia coli</i>	4.256.014	88,24%
41	170	5.492.331	421.399	50,43	<i>Escherichia coli</i>	4.105.025	74,74%
43	99	5.180.000	557.074	50,57	<i>Escherichia coli</i>	4.058.761	78,35%
45	199	5.467.530	241.146	50,33	<i>Escherichia coli</i>	4.740.909	86,71%
46	129	5.246.188	522.601	50,47	<i>Escherichia coli</i>	4.607.897	87,83%
48	171	5.281.578	593.390	50,83	<i>Escherichia coli</i>	4.030.282	76,31%
49	201	5.306.137	422.236	50,61	<i>Escherichia coli</i>	4.059.937	76,51%

51	206	5.302.484	422.369	50,61	<i>Escherichia coli</i>	4.998.633	94,27%
52	207	5.171.231	442.699	50,7	<i>Escherichia coli</i>	4.477.559	86,59%
54	94	5.290.516	625.944	50,44	<i>Escherichia coli</i>	5.103.829	96,47%
55	189	5.152.292	237.058	50,6	<i>Escherichia coli</i>	4.402.175	85,44%
56	269	5.602.707	234.136	50,48	<i>Escherichia coli</i>	4.447.795	79,39%
57	136	5.002.408	291.785	50,47	<i>Escherichia coli</i>	4.600.004	91,96%
58	183	5.412.070	515.420	50,57	<i>Escherichia coli</i>	4.024.846	74,37%
59	210	5.600.264	370.055	50,45	<i>Escherichia coli</i>	4.568.172	81,57%
61	204	5.100.757	187.543	50,54	<i>Escherichia coli</i>	4.216.382	82,66%
62	191	5.021.577	187.228	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.399.795	87,62%
63	912	5.071.572	63.089	50,49	<i>Escherichia coli</i>	4.504.167	88,81%
64	201	5.341.033	291.497	50,46	<i>Escherichia coli</i>	4.022.988	75,32%
65	331	5.527.180	276.943	50,37	<i>Escherichia coli</i>	4.285.100	77,53%
66	208	5.210.649	380.369	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.226.346	81,11%

67	155	5.173.093	404.165	50,68	<i>Escherichia coli</i>	4.517.707	87,33%
68	192	5.477.718	442.144	50,32	<i>Escherichia coli</i>	4.076.339	74,42%
69	193	4.988.335	230.206	50,53	<i>Escherichia coli</i>	4.471.414	89,64%
70	176	5.402.238	314.368	50,67	<i>Escherichia coli</i>	4.536.728	83,98%
71	187	5.114.241	429.287	50,73	<i>Escherichia coli</i>	4.596.750	89,88%
72	159	5.321.711	295.652	50,51	<i>Escherichia coli</i>	4.677.102	87,89%
74	1.718	4.794.345	19.334	50,81	<i>Escherichia coli</i>	4.281.921	89,31%
75	149	5.164.168	451.599	50,73	<i>Escherichia coli</i>	4.050.203	78,43%
76	113	4.916.326	610.409	50,79	<i>Escherichia coli</i>	3.989.275	81,14%
77	225	5.117.456	228.859	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.318.536	84,39%
78	303	5.242.895	193.610	50,52	<i>Escherichia coli</i>	4.407.213	84,06%
79	160	4.905.800	288.545	50,66	<i>Escherichia coli</i>	4.175.704	85,12%
80	169	5.225.902	404.014	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.500.469	86,12%
82	158	4.998.177	281.483	50,67	<i>Escherichia coli</i>	4.380.451	87,64%

83	266	5.848.364	435.124	50,51	<i>Escherichia coli</i>	4.123.483	70,51%
87	126	5.179.492	725.234	50,42	<i>Escherichia coli</i>	4.476.518	86,43%
88	160	5.264.353	534.830	50,64	<i>Escherichia coli</i>	4.044.295	76,82%
89	216	5.285.183	397.562	50,68	<i>Escherichia coli</i>	4.040.411	76,45%
90	212	5.447.184	333.349	50,45	<i>Escherichia coli</i>	4.460.136	81,88%
93	209	5.450.692	333.286	50,44	<i>Escherichia coli</i>	4.319.404	79,25%
95	217	5.064.987	422.401	50,53	<i>Escherichia coli</i>	4.210.669	83,13%
98	1.370	6.647.734	56.379	50,49	<i>Escherichia coli</i>	4.717.225	70,96%
99	109	5.247.365	414.997	50,5	<i>Escherichia coli</i>	4.532.220	86,37%

Fonte: Elaborada pela autora

**APÊNDICE B – PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS POR
ISOLADO**

	LOTE ATB	CTF	ENRO	NAL	NIT	AZI	CRO	NOR	AMP	SUT	GEN	LINC+ ESPEC
	C+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
REGIÃO SUL	1	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	I
	2	I	I	R	I	S	S	S	I	R	S	S
	4	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
	5	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R
	6	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S
	7	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S
	8	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
	18	R	I	R	I	S	R	S	R	S	R	S
	19	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	20	R	I	R	S	S	I	S	R	S	R	S
	23	S	R	R	S	S	S	R	S	E	S	S
	24	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	S
	26	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	28	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S
	29	I	S	R	S	S	R	S	R	S	I	S
	30	I	S	R	S	S	I	S	R	S	S	S
	31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	33	R	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S
	34	S	I	R	S	R	S	S	S	I	S	S
	35	R	R	R	S	S	R	I	R	S	S	S
	36	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S
	37	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	38	R	R	I	S	S	R	S	R	R	R	S
	39	R	R	R	I	S	R	R	R	S	S	S
	40	R	R	R	S	S	R	I	R	S	R	R
	41	R	R	R	S	S	R	I	R	S	R	R
	43	R	R	R	S	S	R	S	R	S	I	S
45	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
48	R	I	I	S	S	R	S	R	R	S	I	
49	R	I	I	S	S	R	S	R	S	S	S	
51	R	I	R	S	S	R	S	R	S	S	S	
52	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	S	
54	R	R	R	R	S	R	I	R	S	I	R	

	55	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I
	56	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	S
	57	R	I	R	S	S	R	S	R	S	S	S
	58	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	59	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R
REGIÃO SUDESTE	61	S	I	R	S	S	S	S	S	R	R	S
	62	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S
	63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	64	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
	65	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S
	66	R	R	R	S	S	R	S	R	R	I	S
	67	I	I	I	I	S	S	S	S	R	S	R
	68	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	69	S	R	R	S	S	S	I	S	S	R	S
	70	R	I	R	S	S	R	S	R	S	I	S
	71	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	72	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S
	74	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	S
	75	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	76	S	R	R	S	R	R	I	S	R	R	R
	77	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S
78	S	R	R	R	S	I	S	R	S	I	S	
79	R	I	R	S	S	R	S	R	R	R	S	
80	S	R	R	S	S	S	R	R	I	S	S	
REGIÃO NORDESTE	82	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S
	83	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	87	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S
	88	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S
	89	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	I
	90	I	I	R	I	S	S	S	I	R	S	S
	93	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
	95	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R
	98	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S
99	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S	

Fonte: Elaborada pela autora

R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

C+ (Controle positivo) – ATCC 25922.

* Cefotiofur (CFT): Sensível (≥ 21); Intermediário (18–20); Resistente (≤ 17).

* Enrofloxacin (ENRO): Sensível (≥ 23); Intermediário (17–22); Resistente (≤ 16).

* Ácido Nalidíxico (NAL): Sensível (≥ 19); Intermediário (14-18); Resistente (≤ 13).

* Nitrofurantoína (NIT): Sensível (≥ 17); Intermediário (15-16); Resistente (≤ 14).

* Azitromicina (AZI): Sensível (≥ 13); Resistente (≤ 12).

* Ceftriaxona (CRO): Sensível (> 23); Intermediário (20-22); Resistente (< 19).

* Norfloxacin (NOR): Sensível (> 17); Intermediário (13-16); Resistente (≤ 12).

* Ampicilina (AMP): Sensível (≥ 17); Intermediário (14-16); Resistente (≤ 13).

- * Sulfazotrim (SUT): Sensível (≥ 16); Intermediário (11-15); Resistente (≤ 10).
- * Gentamicina (GEN): Sensível (≥ 15); Intermediário (13-14); Resistente (≤ 12).
- * Lincomicina+ espectinomicina (LINC+ESPEC): Sensível (≥ 13); Intermediário (12-11); Resistente (≤ 10).

**APÊNDICE C – DADOS BRUTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS
AMOSTRAS**

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/10x0XrYpZfxtjb-wIR-01Y22fgx-zTqBK/edit?usp=sharing&ouid=111374211294780197338&rtpof=true&sd=true>

APÊNDICE D – MATERIAL COMPLEMENTAR

PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

Capítulos de livros

- **Vírus contaminantes do ambiente em uma abordagem de Saúde Única. Ciências ambientais e da saúde na atualidade: insights para alcançar os objetivos para o desenvolvimento sustentável**

DAHMER, M.; PILATI, G. V. T.; ELOIS, M. A.; SAVI, B. P.; CADAMURO, R. D.; CAIO, H. Y.; PENSO, J. Z.; PADILHA, D. A.; SOUSA, A. K. F.; SOUZA, D. S. M.; FONGARO, G. Editora GS4, 1 ed.:, 2022, v. , p. 43-.

- **VigEAI: Vigilância Epidemiológica Ambiental Integrativa - Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil: Bases da Ferramenta epidemiológica para o monitoramento viral a partir do esgoto sanitário.**

WACHTER, J. K.; CADAMURO, R. D.; SAVI, B. P.; ELOIS, M. A.; PILATI, G. V. T.; SOUZA, E. B.; PADILHA, D. A.; RODRIGUES, V. D.; ROSSI, E. M.; MALUTTA, S.; SOUZA, D. S. M.; BARAZZETTI, F. H.; GRISARD, H. B. S.; SCHORNER, M. A.; BAZZO, M. L.; FONGARO, G. Editora GS4, 1 ed.: , 2023, v. , p. 65-86.

- **Enteroviruses**

SAVI, B. P.; CADAMURO, R. D.; ELOIS, M. A.; PILATI, G. V. T.; DAHMER, M.; CAIO, H. Y.; PENSO, J. Z.; SOUZA, D. S. M.; FONGARO, G. Environmental and Food Virology, 1ed.:, 2023, v. , p. 26-.

Artigos completos publicados em periódicos

- **Bacteriophage-Associated Antimicrobial Resistance Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Brazilian Poultry**

PILATI, G.V.T.; CADAMURO, R.D.; FILHO, V.B.; DAHMER, M.; ELOIS, M.A.; SAVI, B.P.; SALLES, G.B.C.; MUNIZ, E.C.; FONGARO, G.

Colibacillosis is a disease caused by *Escherichia coli* and remains a major concern in poultry production, as it leads to significant economic losses due to carcass condemnation and clinical symptoms. The development of antimicrobial resistance is a growing problem of worldwide concern. Lysogenic bacteriophages are effective vectors for acquiring and disseminating antibiotic resistance genes (ARGs). The aim of this study was to investigate the complete genome of *Escherichia coli* isolates from the femurs of Brazilian broiler chickens in order to investigate the presence of antimicrobial resistance genes associated with bacteriophages. Samples were collected between August and November 2021 from broiler batches from six Brazilian states. Through whole genome sequencing (WGS), data obtained were analyzed for the presence of antimicrobial resistance genes. Antimicrobial resistance genes against the aminoglycosides class were detected in 79.36% of the isolates; 74.6% had predicted sulfonamides resistance genes, 63.49% had predicted resistance genes against β -lactams, and 49.2% of the isolates had at least one of the tetracycline resistance genes. Among the detected genes, 27 have been described in previous studies and associated with bacteriophages. The findings of this study highlight the role of bacteriophages in the dissemination of ARGs in the poultry industry.

- **Bacteriophages as Biotechnological Tools**

ELOIS, M. A.; DA SILVA, R.; PILATI, G. V. T.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G.

Bacteriophages are ubiquitous organisms that can be specific to one or multiple strains of hosts, in addition to being the most abundant entities on the planet. It is estimated that they exceed ten times the total number of bacteria. They are classified as temperate, which means that phages can integrate their genome into the host genome, originating a prophage that replicates with the host cell and may confer immunity against infection by the same type of phage; and lytics, those with greater biotechnological interest and are viruses that lyse the host cell at the end of its reproductive cycle. When lysogenic, they are capable of disseminating bacterial antibiotic resistance genes through horizontal gene transfer. When professionally lytic-that is, obligately lytic and not recently descended from a temperate ancestor-they become allies in bacterial control in ecological imbalance scenarios; these viruses have a biofilm-reducing capacity. Phage therapy has also been advocated by the scientific community, given the uniqueness of issues related to the control of microorganisms and biofilm production when compared to other commonly used techniques. The advantages of using bacteriophages appear as a viable and

promising alternative. This review will provide updates on the landscape of phage applications for the biocontrol of pathogens in industrial settings and healthcare.

Resumos publicados em anais de congressos

- **Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses in Brazil.**

PILATI, G. V. T.; DAHMER, M.; SAVI, B. P.; SALLES, G. B. C.; MUNIZ, E. C.; VOGT, J. R.; FONGARO, G. Conferência FACTA WPSA-Brasil 2023: Brasil, o supermercado do mundo!, 2023.

- **Real scale monitoring of the behavior of human enteric and respiratory viruses in Lagoa da Conceição after sanitary effluent overflow.**

SAVI, B. P.; PILATI, G. V. T.; ELOIS, M. A.; SOUZA, D. S. M.; CASTRO, D. G.; LEITE, N. K.; FONGARO, G. Congresso Brasileiro de Virologia, 2022, Porto Seguro (BA).

- **Bioprospecting of bacteriophages for biocontrol of pathogenic and spoilage bacteria in the food industry.**

ELOIS, M. A.; CAIO, H. Y.; WACHTER, J. K.; PILATI, G. V. T.; SILVA, R.; OLIVEIRA, R. R.; OMORI, W. P.; FONGARO, G. Congresso Brasileiro de Virologia, 2022, Porto Seguro (BA).

- **Prevalence and antimicrobial resistance profile of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from Brazilian poultry.**

PILATI, G. V. T.; SALLES, G. B. C.; SAVI, B. P.; MUNIZ, E. C.; VOGT, J. R.; NASCIMENTO JUNIOR, D. V.; FONGARO, G. Conferência FACTA-WPSA Brasil, 2022, Campinas. Anais do Prêmio Lamas 2022. p. 68-69.

- **Seroprevalence of avian metapneumovirus A and B in unvaccinated broilers in Brazil.**

SALLES, G. B. C.; PILATI, G. V. T.; MUNIZ, E. C.; VOGT, J. R.; LIMA NETO, A. J.; NASCIMENTO JUNIOR, D. V.; FONGARO, G. Conferência FACTA-WPSA Brasil, 2022, Campinas. Anais do Prêmio Lamas 2022. p. 66-67.

- ***Neofusicoccum parvum*, endophytic fungi isolated from *Avicennia schaueriana* mangrove of the region of Itacorubi, Florianópolis-SC, applied to virucide and antiviral activity.**

CADAMURO, R. D.; BASTOS, I. M. A. S.; ZUCHI, I. D. P.; PAVI, C. P.; PENSO, J. Z.; ELOIS, M. A.; PILATI, G. V. T.; FONGARO, G. Congresso Brasileiro de Virologia, 2022, Porto Seguro (BA).

- **Evaluation of viral contamination in Lagoa da Conceição after an evapoinfiltration lagoon extravasation accident.**

SAVI, B. P.; FONGARO, G.; PILATI, G. V. T.; CASTRO, D. G.; LEITE, N. K. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia, 2021, Virtual. Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa, 2021. v. 32.

Estágios

- **Universidad de Burgos**

Microbiology Division Centre for Emerging Pathogens and Global Health and Microbiology Section

Período: 7 de setembro a 11 de novembro de 2022

Supervisão: Prof. Dr. David Rodríguez-Lázaro.

- **MercoLab Laboratórios LTDA**

Setores de Biologia Molecular e Sorologia

Período: 23 de janeiro a 10 de fevereiro de 2023

Supervisão: Dr. Jorge Augusto Petrolí Marchesi.