

BEATRIZ QUEIROZ DOS SANTOS

Caracterização de sorogrupos predominantes em *Escherichia coli* patogênica para aves e perfil de virulência

São Paulo
2023

BEATRIZ QUEIROZ DOS SANTOS

Caracterização de sorogrupos predominantes em *Escherichia coli* patogênica para aves e perfil de virulência

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Terezinha Knöbl

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4313	Santos, Beatriz Queiroz dos
FMVZ	Caracterização de sorogrupos predominantes em <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves e perfil de virulência / Beatriz Queiroz dos Santos. – 2023. 43 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2023.
	Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.
	Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 24th February 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Molecular characterization of Avian Pathogenic Escherichia coli - APEC*", protocol number CEUAX 3335080321 (ID 001776), under the responsibility Terezinha Knöbl, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day March 11, 2021.

Certificamos que a proposta intitulada: "*CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Escherichia coli PATOGÊNICA AVIÁRIA - APEC*", protocolado sob o CEUAX nº 3335080321, sob a responsabilidade de Terezinha Knöbl, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 11 de março de 2021.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Beatriz Queiroz dos

Título: Caracterização de sorogrupos predominantes em *Escherichia coli* patogênica para aves e perfil de virulência

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

As primeiras pessoas que vêm a minha mente quando penso em agradecimento sempre serão meus pais, José e Lucimar, por todos os ensinamentos, pela importância da união do trabalho duro e os estudos. E minha irmã, por sempre acreditar que posso ser mais.

À minha orientadora, Terezinha Knöbl, por me receber de braços abertos e sempre nos dar o apoio necessário para realização das atividades. A Ana Angelita, que mesmo distante nunca deixou de cuidar e permanecer com sua amizade e amparo.

À banca, pelo tempo e considerações concedidos.

Toda equipe do Laboratório de Medicina Aviária, principalmente Fernanda, Letícia, Renata e Victória, pelo acolhimento, trocas de ideias e experiências.

Aqueles que me apresentaram São Paulo pela visão do amor e amizade, Carlos, Guilherme e Cristófer. E aos amigos de longa data Laura Mantelatto e Arthur Massei, que mesmo longe, sempre me acompanham.

Como apoio, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Processo do Financiamento 001 (Processo: 88887.604351/2021-00).

RESUMO

SANTOS, Beatriz Queiroz dos. **Caracterização de sorogrupos predominantes em *Escherichia coli* patogênica para aves e perfil de virulência.** 2023. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O Brasil tem se destacado no cenário da avicultura mundial, mas no momento atual, existem alguns desafios em relação ao controle de doenças bacterianas, incluindo a colibacilose aviária. A colibacilose provoca redução de lucros por diminuição na produção, aumento de condenações, mortalidade e gastos terapêuticos. A virulência de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) ainda não foi completamente elucidada e existem muitas lacunas sobre o tema no Brasil. Esse estudo teve como objetivo caracterizar *E. coli* patogênica para aves isoladas em quadros clínicos, por meio de análise molecular para fatores de virulência, classificação filogenética, sorotipagem molecular para os sorogrupos O1, O53 e O78, sorotipagem por soroaglutinação rápida para O2 e determinação da frequência de ST-23, ST-73, ST-95, ST-117, ST-131 e ST-355; além de avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos. Um total de 80 isolados foi analisado e 79% (n=63/80) foram classificados como APEC. A maioria das estirpes pertence aos filogrupos G (17,46%; n=11/63) e B2 (11,11%; n=7/63). Dentre os STs pesquisados, no Paraná foram identificados ST-23, 11,11% (n=7/63), ST-95, 7,93% (n=5/63) e ST-117, 9,52% (n=6/63). No Rio Grande do Sul ST-73 e ST-131, com 1,59% (n=1/63) em ambos. O principal sorogrupo identificado foi o O2, 11,11% (n =7/63), seguido de O78, 4,76% (n=6/63). A multirresistência alcançou 55,55% (n=35/63), e os maiores índices de resistência observados foram para Amoxicilina, 71,43% (n=45/63), e Tetraciclina, 52,38% (n=33/63).

Palavras-chave: Colibacilose. APEC. Sorogrupo. Filogrupo. STs.

ABSTRACT

SANTOS, Beatriz Queiroz dos. **Characterization of main serogroups and virulence profile of avian pathogenic *Escherichia coli***. 2023. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Brazil has excelled in the world poultry scenario, but at the present time, there are some challenges in the relation to control of bacterial diseases, including avian colibacillosis. Colibacillosis causes a reduction in profits due to a decrease in production, an increase in condemnation of carcasses, mortality, and medical care expenses. The virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) has not yet been fully elucidated and there are many gaps on the subject in Brazil. This study aimed to characterize pathogenic *E. coli* for birds in clinical settings, through molecular analysis for virulence factors, phylogenetic classification, molecular serotyping for serogroups O1, O58 and O78, serotyping by rapid seroagglutination for O2 and inheritance of frequency of ST-23, ST-73, ST-95, ST-117, ST-131 and ST-355; in addition to evaluating the antimicrobial resistance profile. A total of 80 isolates were analyzed and 79% (n=63/80) were classified as APEC. Most strains belong to phylogroups G (17,46%; n=11/63) and B2 (11,11%; n=7/63). Among the researched STs, in Paraná, ST-23, 11,11% (n=7/63), ST-95, 7,93% (n=5/63), and ST-117, 9,52% (n=6/63). In Rio Grande do Sul, ST-73 and ST-131, with 1,59% (n=1/63) in both. The main serogroup identified was O2, 11,11% (n=7/63), followed by O78, 4,76% (n=6/63). Multidrug resistance reached 55,55% (n=35/63), and two main antibiotics with resistance in the isolates were Amoxicilin, 71,43% (n=45/63) and Tetracycline, 52,38% (n=33/63).

Keywords: Colibacillosis. APEC. Serogroup. Phylogroup. STs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

DNA Ácido desoxirribonucleico

OmpT - *Episomal outer membrane protease gene* – Gene da protease da membrana externa epissomal

iSS - *Episomal increased serum survival gene* – Gene epissomal de sobrevivência sérica aumentada

hlyF - *Putative avian hemolysin* – Hemolisina aviária putativa

iutA - *Aerobactin siderophore receptor gene* – Gene do receptor de sideróforo de aerobactina

iroN - *Salmochelinsiderophore receptor gene* – Gene do receptor de sideróforo da salmonelina

arpA- Gene presente em *E. coli*, com exceção das pertencentes ao filogruppo B2 e F.

chuA - *gene required for heme transport in enterohemorrhagic O157:H7 E. coli* – Gene necessário para o transporte de heme em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7

yjaA - *gene initially identified in the recent complete genome sequence of E. coli K-12* – Gene identificado na sequência completa do genome de *E. coli* K-12

TspE4.C2 – Fragmento anônimo

ExPEC – *extraintestinal pathogenic Escherichia coli* – *E. coli* patogênica extraintestinal

STs – *sequence type*

PFGE – *pulsed field gel eletrophoresis*

LISTA FIGURAS

Figura 1. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC dos isolados clínicos (n=63)	30
Figura 2. Descrição do perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado do Paraná (n=29)	31
Figura 3. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado de São Paulo (n=2)	31
Figura 4. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado de Minas Gerais (n=26).....	32
Figura 5. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado do Rio Grande do Sul (n=6).....	33

LISTA TABELAS

Tabela 1- Descrição dos genes preditivos de STs, número de amostras positivas entre total de isolados e região em que foram encontrados.....29

Tabela 2 – Descrição dos sorogrupos pesquisados, número de amostras positivas entre total de isolados e região em que são encontrados.....29

LISTA QUADROS

Quadro 1- Descrição dos genes, sequência dos <i>primers</i> , temperatura de anelamento, tamanho de amplicon (bp) e referência dos genes utilizados.....	26
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 COLIBACIOSE.....	15
2.2 ESTRUTURA POPULACIONAL E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE <i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)	17
2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS.....	23
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	23
4.3 DETERMINAÇÃO DE ISOLADOS <i>AVIAN PATHOGENIC</i> <i>Escherichia coli</i> (APEC) E FILOGRUPO	23
4.4 PESQUISA DE GENES PREDITIVOS DE STs E SOROGRUPO	25
4.5 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	27
5. RESULTADOS	28
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE APEC POR FILOGRUPO, SOROGRUPOS E STs.....	28
5.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	29
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A avicultura no cenário brasileiro atual é de extrema importância, pois sua produção, em 2021, chegou a 14,329 toneladas de carne de frango, equivalente a R\$108,9 bilhões em valor bruto de produção, tendo crescimento em relação a 2020. Os principais estados exportadores de carne de frango no Brasil são Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais (ABPA, 2022).

O constante crescimento da avicultura pode ser explicado por melhorias em diversos setores, devido à pressão do setor e de consumidores, como ambiência e manejo, refletindo no bem-estar animal e melhor desenvolvimento, genética, nutrição e também sanidade (VOGADO et al, 2016).

Uma das bases para o sucesso e a qualidade da produção nacional é a sanidade das aves, sustentadas por programas de biossegurança e de legislações de defesa animal. Ainda que o setor enfrente desafios constantes frente a patógenos importantes, como *Salmonella* e *Escherichia coli*, há uma busca constante por melhorias no controle, diagnóstico e tratamento das doenças aviárias bacterianas (FOSTER et al, 2021; CHRISTENSEN et al, 2021).

A colibacilose aviária é responsável por perdas econômicas expressivas no setor, por meio de condenação de carcaças totais e parciais, mortalidade e gastos com tratamento, e o ciclo da doença e características do patógeno ainda não estão completamente elucidadas, sendo, então, necessário maiores pesquisas (QUEL et al, 2013; EWERS et al, 2003).

Além dos genes de virulência, novas características estão sendo empregadas para determinar o potencial de patogenicidade da *Escherichia coli*, como a identificação molecular de determinados sorogrupos e a determinação de STs (*Sequence types*) que caracterizam clones de alto risco. O uso de novas ferramentas de diagnóstico é, portanto, imprescindível para uma melhor caracterização dos isolados presentes no campo, e permite definir estratégias de controle e prevenção nos casos de doença primária (JOHNSON, 2022).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COLIBACILOSE AVIÁRIA

A colibacilose aviária é uma doença que tem como agente etiológico *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), podendo ser localizada ou sistêmica. Diferentemente da patogenia da doença causada em mamíferos, normalmente enteropatogênicas, em aves o quadro é caracterizado como uma síndrome, por apresentar diversas lesões, tais como, sepsse hemorrágica ou não, celulites, síndrome da cabeça inchada, aerossaculite, peritonite, salpingite, otite, artrite/osteomielite, perihepatite, onfalite, pericardite, enterite e panoftalmite (NOLAN et al, 2020).

O primeiro relato da doença ocorreu em 1894, por Lignieres, em corujas, nas quais a bactéria foi isolada em fígado, baço e coração. A partir desta data até 1922, isolados de diversas espécies eram inoculados em outras espécies, para se observar diferenças de patogenicidade. E apenas em 1923, foi relatado o primeiro caso de colisepticemia, porém como doença secundária (NOLAN et al, 2020).

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa, bacilo, pertencente à família *Enterobactereacea*, anaeróbia facultativa, com crescimento ótimo a 37°C após 24 horas. As colônias em ágar McConkey apresentam uma morfologia típica, umbilicadas e rosas, e possuem capacidade fermentativa de carboidratos e a produção de gás é variável (EWING, 1986).

A forma de ocorrência da doença ainda não foi completamente elucidada, pois a quantidade e diversidade de genes de virulência presentes em bactérias patogênicas dificultam a sua compreensão, e não há um gene específico que atue como marcador de virulência de APEC. A patogenicidade do agente tem sido atribuída a um conjunto variável de genes relacionados ao processo de adesão bacteriana, produção de sideróforos e toxinas, e infecção de novos sítios do hospedeiro, além do ambiente intestinal (SAROWSKA et al, 2019).

E. coli possui a capacidade de causar doenças em diversas espécies e localizações, com isto não se poderia deixar de averiguar a relação com a APEC

e a saúde pública. Isolados de *Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) foram encontrados em amostras de ovos, frangos e fezes, alertando sobre a possibilidade de as aves atuarem como reservatórios do agente. A similaridade entre as cepas causadoras de colibacilose, meningite neonatal e uropatogênicas está relacionada com a presença de plasmídeos de virulência, que são transmissíveis por meio de conjugação, não apenas com a mesma espécie, mas também com outras bactérias de importância médica, como *Salmonella* spp. (NOLAN et al, 2020).

A capacidade de conjugação também aumenta a importância entre os isolados multirresistentes, pois transmite plasmídeos contendo genes de virulência, resistência a antibióticos, desinfetantes e metais pesados. A transmissibilidade dos isolados de ExPEC e, conseqüentemente, a colonização intestinal com posterior multiplicação de outros sítios é possível de ocorrer, e representa um alerta sobre os riscos de saúde pública (NOLAN et al, 2020).

A transmissão vertical é uma das causas dos impactos causados pela colibacilose, com matrizes acima de 43 semanas detectadas como críticas para a transmissibilidade. É necessário que o controle comece nos primeiros níveis da cadeia, para que seja bem-sucedido. Além da desinfecção de ovos, com novos métodos sendo desenvolvidos, em que não se use formaldeído, é necessário minimizar a utilização dos ovos de chão e promover uma correta limpeza do galpão (CHRISTENSEN et al, 2021).

Ainda não foi esclarecido quais os danos e os pontos críticos para a transmissão horizontal, porém sabe-se que é necessário a adoção de programas de limpeza e desinfecção de todo o galpão, com sistema *all-in-all-out*, permitindo a redução da carga bacteriana em cama, bebedouros e comedouros, prezando pela biossegurança da granja (CHRISTENSEN et al, 2021).

Novos métodos moleculares permitiram detectar a clonabilidade de isolados e identificação de linhagens de maior risco em surtos. Dentre estas ferramentas, destacam-se o PFGE em que são detectados clones por meio de métodos parecidos com impressão digital em DNA; SNPs, como detecção mais detalhada, comparando os polimorfismos dos nucleotídeos, ou STs, em que se

analisam sequências *multilocus*, sendo uma forma mais ampla de comparação global de linhagens de alto risco (CHRISTENSEN et al, 2021).

O controle da APEC por meio de uso de antibióticos está em desuso, por conta da resistência e sua transferência entre a mesma população, além dos riscos de saúde pública. Outras formas estão sendo empregadas, como a utilização de probióticos e produtos de exclusão competitiva, fagos e vacinas, porém, a utilização da última é específica para alguns sorogrupos, sendo necessário o conhecimento prévio sobre o agente em surtos na região (CHRISTENSEN et al, 2021; HAN et al, 2018).

2.2 ESTRUTURA POPULACIONAL E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)

O sorogrupo é determinado pela classificação de Kauffmann, baseada na presença do antígeno O, enquanto o sorotipo é determinado pela identificação adicional do antígeno H, mais comumente, antígeno K e, quando necessário, antígenos fimbriais. O antígeno O é uma porção antigênica presente no LPS (complexo polissacarídeo-fosfolípideo), resistente a ebulição. Quando uma bactéria Gram negativa sofre lise há liberação da parte antigênica (antígenos O, K e H) e também da endotoxina (NOLAN et al, 2019).

Os principais sorogrupos encontrados em APEC são O1, O2 e O78. Dentre estes, o principal relatado em APEC é o O78, também relatado em isolados causadores de diarreia em bovinos, adultos e bezerros, e ovinos, e sepse em humanos. Porém, há a variação de dois principais filogrupos, sendo C e G, o primeiro apresentando variação entre o antígeno H apresentado, assim entre ST-88, com antígeno do flagelo H9, e ST-23, codificando o flagelo H4 (APOSTOLAKOS et al, 2021; MEHAT et al, 2021).

O filogrupo G é extremamente adaptado ao nicho avícola, sendo um dos principais carreadores de plasmídeos de resistência e também virulência, estatisticamente está associado ao ST-117, responsável por surtos recentes na cadeia, e também ao sorogrupo O78 (MEHAT et al, 2021; CLERMONT, 2019).

Os sorogrupos O1 e O2 também são frequentemente associados à APEC, mas também ocorrem em casos de sepse, infecção urinária e meningite neonatal, em humanos. Ambos estão presentes dentro do filogrupo B2 exclusivamente, entretanto, são divididos em subgrupos, sendo o ST-95 o mais prevalente, além de ST-140 e ST-428/429 (MEHAT et al, 2021).

Por meio de MLST é possível atribuir grupos clonais por meio de sequência de sete genes constitutivos. Neste contexto, destacam-se as sequências ST-117, ST-73, ST-131, ST-23, ST-355 e ST-95, presentes tanto em humanos como em animais, sugerindo a participação de ExPEC como agente zoonótico. Atualmente, por meio de STs também é possível afirmar qual o potencial patogênico do isolado, pois, genes de virulência estão se tornando comuns em isolados cecais, porém em isolados clínicos a identificação de STs específicos tem forte correlação com a ocorrência de surtos com características epidemiológicas previsíveis (MANGES et al, 2019; JOHNSON et al, 2022).

Isolados pertencentes a ST-95 podem expressar antígeno O variável, entre O1, O2, O18, O25 e O45, porém o antígeno H se torna seu marcador, pois variam apenas entre H7 e H4, independente de qual antígeno O é codificado. Embora a prevalência de resistência a fluoroquinolona seja mais comum em isolados ST-131 e ST-1193, há estudos na Coreia mencionando a circulação de cepas fluorquinolonas-resistentes pertencentes ao ST-95 (MEHAT et al, 2021; KIM et al, 2020).

ST-131 pertencem principalmente ao filogrupo B2, principais responsáveis por infecções extra intestinais em humanos e isolados em amostras fecais de indivíduos assintomáticos. Já foi muito relacionado ao sorogrupo O25, porém, atualmente, há estirpes sendo isoladas em diversos países com sorogrupo O16:H5 e outros que não são compatíveis com a sorotipagem. Sabe-se que todos pertencentes a este grupo são ExPEC, todavia, os genes de virulência responsáveis não foram definidos, apresentando uma variação e sem um virotipo definido (NICOLAS-CHANOINE et al, 2014).

Resistência a fluoroquinolona e produção a ESBL não são, no momento atual, associados com maior frequência deste subgrupo, porém há estudos prévios indicando a aquisição destes genes (NICOLAS-CHANOINE et al, 2014).

O ST-73 tem sido associado com maior frequência à isolados de infecções humanas, principalmente uropatogênicas, porém, atualmente, estão sendo relacionadas a cães e a surtos de colibacilose, até então não relatado em fonte alimentar (VALAT et al, 2020; CUNHA et al, 2017).

O ST-23 é uma linhagem de ExPEC que está emergindo, sendo considerada como patógeno em humanos e aves, portanto, quando encontradas em cadeias avícolas podem indicar o risco zoonótico, além de serem portadores de genes de multirresistência (MASSELA et al, 2020).

Outro ST globalmente difundido é o ST-355, tendo como fonte amostras retais, de urinas e de produtos de origem aviária, como perus; a resistência bacteriana também é comumente detectada nesta linhagem, incluindo a classe das quinolonas, antimicrobiano usado em tratamentos humanos e também veterinários (RÖDERAVA et al, 2017).

Embora todos esses STs sejam conhecidos pela patogenicidade em diversas fontes, o ST-117 está prevalentemente presente em amostras de origem avícola, sendo uma preocupação quando presente no alimento, pela possibilidade de transmissão para humanos. Estudos recentes de genoma completo demonstraram que há uma diversidade entre genes de virulência relacionados à ExPEC, genes de resistência e ilhas de patogenicidade, demonstrando que não há uma especificidade de hospedeiro, portanto, há um potencial zoonótico (XIA et al, 2022).

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana tem sua importância não apenas para prevenção e tratamento de doenças em medicina veterinária, mas também na saúde pública, com preocupação associada às fontes alimentares portadoras de STs emergentes, mas também devido à presença de genes de virulência e resistência (TOHMAZ et al, 2022).

O uso indiscriminado de antibióticos com objetivos terapêuticos, metafiláticos e profiláticos em toda cadeia produtiva favorecem a seleção de genes de resistência, desde o seu surgimento, com posterior disseminação e

aumento da multirresistência. Ao redor do mundo não há um padrão único de uso, porém tetraciclinas, macrolídeos, sulfonamidas e aminoglicosídeos estão como os mais descritos (TOHMAZ et al, 2022).

A obtenção de resistência é feita de duas formas: mutação cromossômica ou aquisição de plasmídeos por meio de transferência horizontal. Nas enterobactérias a disseminação de resistência plasmidial por conjugação é de extrema importância e atenção, pois favorece o surgimento e a disseminação de superbactérias (MILLAN, 2018).

As diferenças entre a aquisição de resistência nos filogrupos, A e D estão relacionadas ao *fitness* bacteriano, com tendência à disseminação de resistência contra cefalosporinas de terceira geração. O filogrupo B2 não se comporta da mesma maneira, e não há uma correlação entre multirresistência e virulência. Isolados resistentes a Trimetopim-sulfametoxazol, Enrofloxacin, Florfenicol, Neomicina e Furazolidona foram detectados em todos os filogrupos, porém, o filogrupo D foi o que apresentou o maior número de marcadores de resistência (TENAILLON et al, 2010, TOHMAZ et al, 2022).

Desde 2015, a resistência antimicrobiana fenotípica e genotípica em APEC apresentou crescimento expressivo de frequência para várias classes de antibióticos, inclusive beta-lactâmicos e polimixinas (colistina). Algumas estratégias estão sendo adotadas para controlar a disseminação da resistência, incluindo a proibição, na União Europeia e Estados Unidos, do uso destes medicamentos como não terapêuticos, promotores de crescimento, e limitando o uso terapêutico com importância clínica. Porém, para se observar resultados será necessário tempo (KATHAYAT et al, 2021).

Além disso, técnicas alternativas para a substituição do uso de antibióticos, como vacinas, probióticos e bacteriófagos estão sendo desenvolvidas e ampliadas. Há algumas vacinas candidatas, como atenuadas, recombinantes e inativadas, embora a última não apresente graus elevados de anticorpos. Entretanto, a variação de antígenos ExPEC e recombinação com vacinas para *Salmonella* induziu diferentes graus de anticorpos em galinhas (IgA e IgG), com diminuição de carga bacteriana, lesões e mortalidade (KATHAYAT et al, 2021).

Os probióticos são microrganismos ou sua preparação, que atuam com exclusão competitiva na microbiota das aves, ocupando os receptores no intestino, não permitindo a fixação de patógenos, com isso, havendo sua exclusão, além de neutralizar toxinas e estimular o sistema imune. Há alguns microrganismos com esta função, todavia, o *Lactobacillus* é um dos principais. A produção de ácido láctico possui um efeito sobre APEC. Sua aplicação é variável, sendo os principais orais, como gavagem e na ração, com aplicação de maior mão de obra e não proteção nos dias iniciais, e com vacina *in ovo* e aspersão (LI et al, 2021).

Os bacteriófagos são uma alternativa promissora, embora sejam específicos, estão sendo descobertos uma quantidade significativa. Há dois métodos de atuação, líticos ou não líticos, no primeiro caso resultando na morte da bactéria, e o segundo com multiplicação da bactéria, porém com genoma do fago integrado. Além disso, atuam minimizando a formação e diminuindo o biofilme constituído, mas não o excluindo completamente (EID et al, 2022).

Embora estas sejam as principais alternativas a antibióticos, há ainda outras sendo pesquisadas e aperfeiçoadas, como os inibidores de virulência, os quais atenuam ou desarmam mecanismos de ação de patógenos; estimulantes de imunidade inata, impedindo a infecção; e peptídeos antimicrobianos, tendo uma seleção antimicrobiana rápida e efetiva, com pouco desenvolvimento de resistência (KATHAYAT et al, 2021).

3 OBJETIVOS

Caracterizar os isolados de *Escherichia coli* patogênicos para aves provenientes de casos clínicos de colibacilose aviária.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Análise molecular para os fatores de virulência.
- ii) Classificação filogenética.
- iii) Sorotipagem molecular para os sorogrupos O1, O53 e O78.
- iv) Sorotipagem O2 por soroaglutinação rápida.
- v) Determinação da frequência de ST23, ST73, ST95, ST117, ST131 e ST355.
- vi) Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS

Amostras previamente colhidas e identificadas pertencentes ao Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Laboratório de Medicina Aviária, do Departamento de Patologia Comparada da Universidade de São Paulo (USP), deram origem a 80 isolados de *Escherichia coli* provenientes de manifestações clínicas clássicas de colibacilose de matrizes e frangos de corte comerciais (*Gallus gallus*), dos estados de São Paulo (n=3), Minas Gerais (n=31), Rio Grande do Sul (n=6) e Paraná (n=40), de 2015 a 2021. O estudo foi aprovado pela CEUAX – protocolo 3335080321.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura. As amostras foram semeadas em ágar TSA (*Agar Tryptic Soy*, Difco™ – BD®), sendo incubadas à 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, uma alçada dos isolados foi inoculada em 300µL de água miliQ autoclavada em microtubos, que foram centrifugados a 12.800rpm por 3 minutos. Para lavagem, foram adicionados 1mL de água miliQ autoclavada e novamente centrifugados nas mesmas condições. A seguir, depois de descartar o sobrenadante, foi acrescentado 100µL de água miliQ autoclavada e os microtubos foram colocados em banho-seco à 115°C por 15 minutos. Para finalizar, os microtubos foram centrifugados por 12.800rpm por 7 minutos e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ISOLADOS AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli* (APEC) E FILOGRUPO

A caracterização de virulência e, conseqüentemente, a determinação de quais amostras se enquadravam como APEC foi realizada por meio da amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase chain reaction) para os genes *ompT*, *iss*, *iutA*, *hlyF*, *iroN*, sendo necessário positivar

ao menos três destes para ser qualificado como APEC (JOHNSON et al., 2008). Após a determinação quais isolados classificaram como APEC, foram realizados os demais testes.

A mistura para PCR *duplex* foi constituída por: 4µL MasterMix (FIREPol® com 12,5 mM MgCl₂), 0,6µL de cada *primer* dos genes de *iss* e *ompT*, 10,6µL de água ultrapura autoclavada (LGC Biotecnologia®) e 3µL de DNA da amostra. Enquanto a mistura para *triplex* foi realizada com: 4µL MasterMix (FIREPol® com 12,5 mM MgCl₂), 0,6µL de cada *primer* dos genes de *iutA*, *hlyF* e *iroN* 9,4µL de água ultrapura autoclavada (LGC Biotecnologia®) e 3µL de DNA da amostra.

A amplificação foi realizada em termociclador (C1000 Touch™ - BioRad®) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, com anelamento 56 °C por 30 segundos, ciclo de extensão por 72 °C por 1 minuto e para final de extensão 72 °C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por meio de corrida eletroforética (PowerPac® Universal – Bio Rad®. Owl EasyCast™ B2-BP) a 100V por 1 hora e 15 minutos em gel de agarose 1,5% (LGC Biotecnologia®) e para coloração foi utilizado Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia®). Com o marcador de peso molecular de 100bp DNA ladder (Sinapse inc®)

A visualização foi por meio de luz ultra-violeta em sistema de fotodocumentação (Molecular Imager® System with Image Lab™ Software – Bio Rad®). Analisando e comparando os tamanhos de fragmentos com marcador e cepas de referência pertencentes ao Laboratório de Medicina Aviária USP.

O filogruppo foi caracterizado por meio de reação de cadeia de polimerase (PCR – Polymerase chain reaction) dos genes *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, e classificado conforme Clermont et al. (2012). E, quando determinado como filogruppo F ou B2, realizados os genes *cfaB* e *ybdG* para determinação de filogruppo F, B2 ou G, conforme Clermont et al. (2019).

A mistura para PCR *duplex* foi constituída por: 4µL MasterMix (FIREPol® com 12,5 mM MgCl₂), 0,6µL de cada *primer* dos genes de *chuA* com *TspE4.C2*

e *arpa* com *yjaA* 10,6µL de água ultrapura autoclavada (LGC Biotecnologia®) e 3µL de DNA da amostra.

Para os genes *cfaB* e *ybdG* foi realizado uma mistura para PCR *uniplex* constituída por: 4µL MasterMix (FIREPol® com 12,5 mM MgCl₂), 0,6µL de cada primer dos genes de respectivo, 11,8 µL de água ultrapura autoclavada (LGC Biotecnologia®) e 3µL de DNA da amostra.

A amplificação foi realizada em termociclador (C1000 Touch™ - BioRad®) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, com anelamento 59 °C por 30 segundos, ciclo de extensão por 72 °C por 1 minuto e para final de extensão 72 °C por 5 minutos.

As próximas etapas foram realizadas como nos genes de virulência, sendo corrida eletroforética e análise dos fragmentos obtidos, como descrito acima.

4.4 PESQUISA DE GENES PREDITIVOS DE STs E SOROGRUPOS

Para a padronização das reações de PCR que identificam os STs principais, ST117, ST131, ST73, ST23, ST355 e ST95, e os genes dos sorogrupos Og1, Og53 e Og78 foram utilizadas amostras pertencentes a cada STs e sorogrupo correspondente pertencentes ao Laboratório de Medicina Aviária USP, determinados previamente por sequenciamentos de DNA total. As sequências de *primers* e as temperaturas utilizadas estão no quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos genes, sequência dos *primers*, temperatura de anelamento, tamanho de amplicon (bp) e referências utilizadas.

Gene	Sequência de Primers (5'3')	Anelamento	Amplicon	Referências
ST23	TGGAGCTAAATGACCCGAC AACCAGACGTGCCACATTG	56°C	263	Johnson et al., 2022
ST73	TGGTTTTACCATTTTGTCTGGA GGAAATCGTTGATGTTGGCT	56°C	490	Doumith et al., 2015
ST95	ACTAATCAGGATGGCGAGAC ATCACGCCCATTAATCCAGT	56°C	200	Doumith et al., 2015
ST117	GATGCCATAAGGAAGAACGAG CGAGCCATTGGATTGCAAC	56°C	360	Johnson et al., 2022
ST131	GACTGCATTTTCGTCGCCATA CCGGCGGCATCATAATGAAA	56°C	310	Doumith et al., 2015
ST355	TCAGAGAAGATTGAAGAGGGCG AATACTCCACCTGAGAGTCCCG	56°C	305	Johnson et al., 2022
Og1 (wzx)	GTGAGCAAAAGTGAAATAAGGAACG CGCTGATACGAATACCATCCTAC	59°C	1098	Iguchi et al., 2015
Og53 (wzy)	AAGCTCAAGGGGCATGTTTT TTCCCCTAACCCCTGCACTAA	59°C	800	Iguchi et al., 2015
Og78 (wzx)	GGTATGGGTTTGGTGGTA AGAATCACAACCTCTCGGCA	53°C	992	Iguchi et al., 2015

Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

A reação de PCR foi realizada com uma mistura uniplex constituída por: 4µL MasterMix (FIREPol® com 12,5 mM MgCl₂), 0,6µL de cada *primer* dos respectivos genes, 11,8 µL de água ultrapura autoclavada (LGC Biotecnologia®) e 3µL de DNA da amostra.

A amplificação foi realizada em termociclador (C1000 Touch™ - BioRad®) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, com anelamento com temperatura específica de cada gene por 30 segundos, ciclo de extensão por 72°C por 1 minuto e para final de extensão 72 °C por 5 minutos.

A corrida eletroforética e a visualização dos fragmentos foram realizados da mesma maneira citada anteriormente.

4.5 DETERMINAÇÃO DE SOROGRUPO O2 POR SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA

As amostras foram semeadas em ágar TSA (*Agar Tryptic Soy*, Difco™ – BD®) e incubadas por 18 a 24 horas à 37 °C. Em uma lâmina de microscópio foram acrescentados 20µL de salina 0,5% estéril e uma quantidade de colônias, por meio de alça de plástico, e homogeneizado. Após, acrescentado o anti-soro específico para sorogrupo O2 e novamente feito a homogeneização. Quando positivo, foi observado grumos. Como controle foram utilizadas cepas de referência pertencentes à Coleção de culturas do Laboratório de Medicina Aviária USP, cujo DNA total foi previamente sequenciado.

4.6 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com o CLSI (2018). Os isolados de *E. coli* foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton, incubados a 37°C por 18-24h. Posteriormente as colônias foram suspensas em PBS até atingir a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo, com auxílio de um suabe estéril, foi aplicado na superfície do Ágar Mueller-Hinton em três direções diferentes na sequência foram distribuídos os discos de antimicrobianos: Fosfomicina (FOT-200µg), Tetraciclina (TET- 30µg), Sulfametoxazol-Trimetropim (SUT- 23,75/1,25 µg) Gentamicina (GEN-10µg), Ciprofloxacina (CIP-5µg), Cefotaxima (CTX- 30µg), Norfloxacina (NOR- 10µg), Enrofloxacin (ENO - 5µg), Amoxicilina (AMO- 10 µg), Ceftiofur (CTF - 30µg), Neomicina (NEO-30µg), Estreptomicina (EPT - 10 µg), Florfenicol (FLF- 30µg) e Doxiciclina (DOX- 30 µg). As placas foram incubadas de 18-24h a 37°C. Posteriormente os halos de inibição foram mensurados e comparados com a tabela de Enterobacteriaceae (CLSI, 2018). Como controle do teste foi utilizado a cepa de *E.coli* ATCC 25922.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE APEC POR FILOGRUPO, SOROGRUPOS E STs.

Dos isolados analisados 79,0% (n=63/80) foram classificados como APEC, a partir de então, apenas estas estirpes foram caracterizadas genotípica e fenotipicamente.

Dentre os genes de virulência pesquisados, *hlyF* foi o único presente em todas as amostras (n=63/63), seguido por *ompT* (96,82%, n=61/63), *iss* (95,24%, n=60/63), *iroN* (92,06%, n=58/63) e, por fim, *iutA* em 88,88% (n=56/63).

O principal filogrupos identificado foi o G, detectado em 17,46% (n=11/63) dos isolados, presente na maioria dos estados, exceto em Minas Gerais. Em Minas Gerais houve predomínio do filogrupos E, representando 92% (n=7/26).

Outros filogrupos identificados foram B2, 11,11% (n=7/63); A, 9,52% (n=6/63); A ou C, 7,94% (n=5/63); D ou E, 6,35% (n=4/63) e B1, 4,76% (n=3/63). Os demais foram classificados como desconhecido, somando 28,57% (n=18/63) dos isolados avaliados.

Na pesquisa para determinação preditiva dos STs, os principais genes encontrados sugerem a presença de ST-23, ST-117 e ST-95, na frequência de ocorrência de 11,11% (n=7/63); 9,52% (n=6/63) e 7,93% (n=5/63), respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 1. Enquanto o ST-131 e ST-73 representam 1,59% (n=1/63) e o ST-355 negativou em todos os isolados. A confirmação destes resultados foi realizada posteriormente por sequenciamento de genoma total, em outro projeto de pesquisa.

O ST-117, 20,69% (n=6/29); o ST-23, 24,14% (n=7/29); e o ST-95, 17,24% (n=5/29) foram detectados apenas em amostras do Paraná. Enquanto o ST-131 e o ST-73 (ambos com 16,66%, n=1/6) foram identificados no Rio Grande do Sul. Minas Gerais e São Paulo não tiveram STs destas linhagens de alto risco detectados.

Tabela 1. Descrição dos genes preditivos de STs, número de amostras positivas entre total de isolados e região em que foram encontrados.

ST	Amostras positivas (N=63)	Porcentagem (%)	Estados
ST23	7	11,11	Paraná
ST73	1	1,59	Rio Grande do Sul
ST95	5	7,93	Paraná
ST117	6	9,52	Paraná
ST131	1	1,59	Rio Grande do Sul
ST355	0	0	Nenhum

Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

O sorogrupo O2, foi o principal entre as amostras, 11,11% (n=7/63), seguido pelo O78, 4,76% (n=3/63); O1, 1,59% (n=1/63) e O53, 1,59% (n=1/63), encontrados nos estados conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos sorogrupos pesquisados, número de amostras positivas entre total de isolados e região em que foram encontrados.

Sorogrupo	Amostras positivas (N=63)	Porcentagem (%)	Estados
O1	1	1,59	Minas Gerais
O2	7	11,11	Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul
O53	1	1,59	Minas Gerais
O78	3	4,76	Paraná e Rio Grande do Sul.

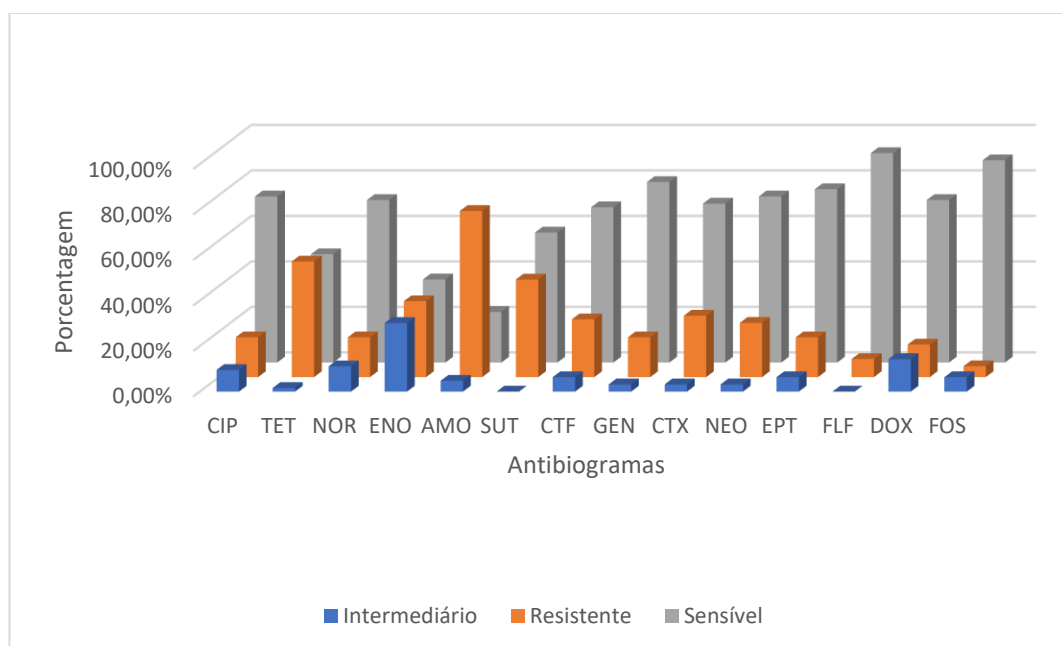
Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

5.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Quando se trata de resistência a antimicrobiano 55,55% (n=35/63) apresentaram multirresistência, sendo que nenhum antibiótico dentre os testados apresentou sensibilidade em todos os isolados. Os que apresentaram

maior resistência foram Amoxicilina, 71,43%, (n=45/63) e Tetraciclina, 52,38% (n=33/63), enquanto os que apresentaram maior sensibilidade foram Fosfomicina e Gentamicina, com percentuais de 90,48% (n=57/63) e 79,36% (n=50/63), respectivamente, conforme ilustrado na Figura 1.

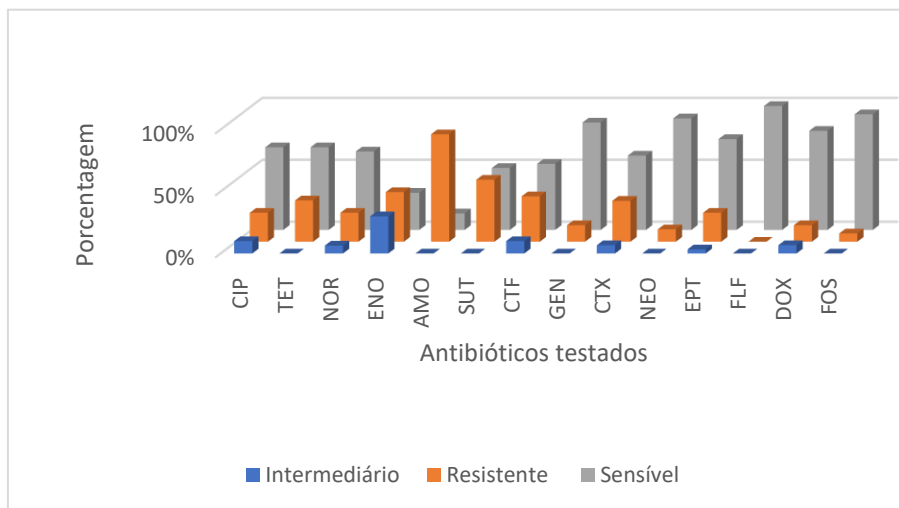
Figura 1. Descrição do perfil de resistência antimicrobiana de APEC em isolados clínicos (n=63)



Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

Quando analisados os resultados de cada estado, observou-se maior frequência de multirresistência no Paraná 62,07% (n=18/29), com taxas de resistência para Amoxicilina de 89,65% (n=26/29); seguido de Sulfametoxazol-trimetropim, 51,72% (n=15/29); e Enrofloxacin, 41,38% (n=12/29). O antibiótico Florfenicol apresentou todos os isolados com sensibilidade (n=29/29), seguidos por Fosfomicina, 93,10% (n=27/29) e Gentamicina, 86,21% (n=25/29). Os dados referentes a este estado estão representados na Figura 2.

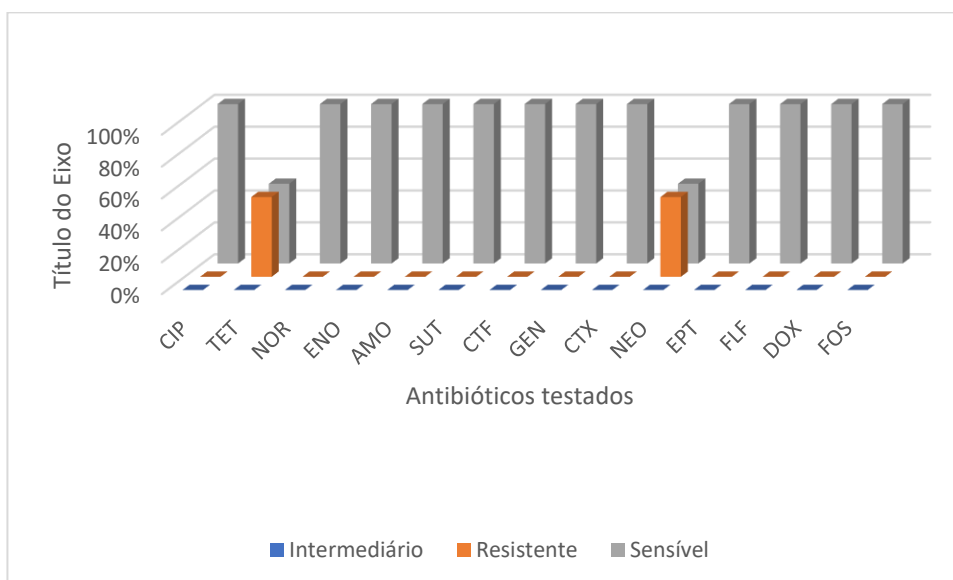
Figura 2. Descrição do perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado do Paraná (n=29)



Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

Em São Paulo, o único estado que não apresentou multirresistência, os isolados (n=2/2) foram sensíveis a Ciprofloxacina, Norfloxacin, Sulfametoxazol-Trimetropim, Ceftiofur, Gentamicina, Cefotaxima, Estreptomicina, Doxiciclina e Fosfomicina, conforme ilustra a Figura 3.

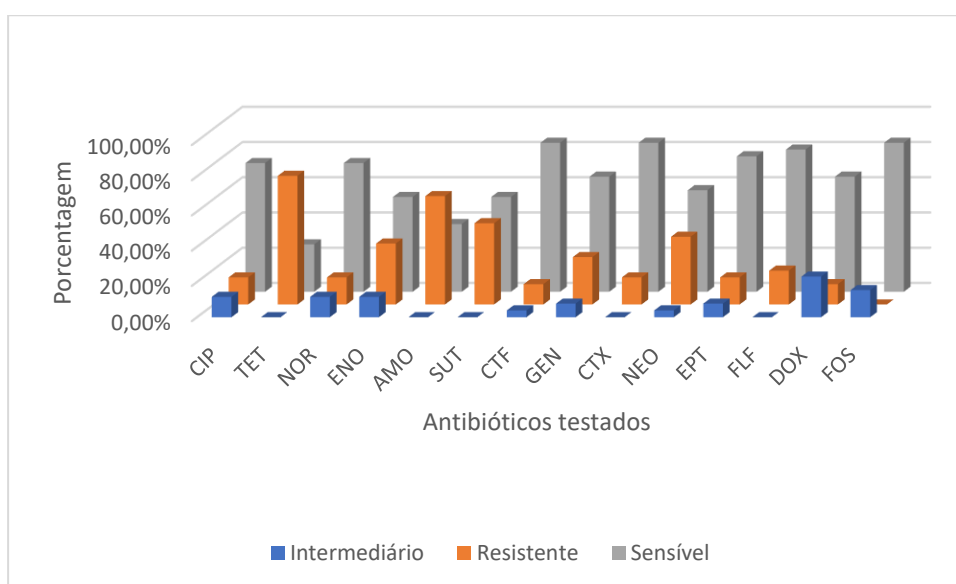
Figura 3. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado de São Paulo (n=2)



Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

Em Minas Gerais, os isolados multirresistentes representaram 61,54% (n=16/26), tendo como o antimicrobiano com maior número de isolados com resistência a Tetraciclina, 73,08% (n=19/26); e Amoxicilina, 61,54% (n=16/26) (FIGURA 4). Os maiores índices de sensibilidades foram para Fosfomicina 84,61% (n=22/26) e Estreptomicina, 76,92% (n=20/26).

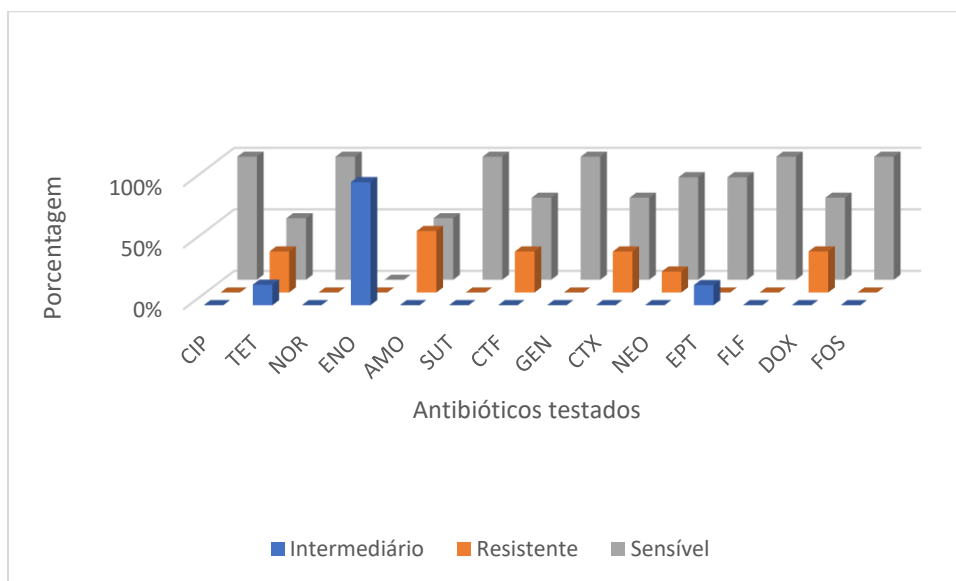
Figura 4. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado de Minas Gerais (n=26).



Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

O Rio Grande do Sul, assim como demonstrado na Figura 5, também houve um predomínio de isolados sensíveis, com apenas 16,33% (n=1/6) de multirresistente. O medicamento com maior resistência foi a Amoxicilina, com 50% (n=3/6).

Figura 5. Descrição perfil de resistência antimicrobiana de APEC isoladas no estado do Rio Grande do Sul (n=6).



Fonte: DOS SANTOS, BQ. (Dissertação, 2023).

6 DISCUSSÃO

A colibacilose aviária é uma doença que, atualmente, responde por grandes prejuízos na indústria, seja por condenação de carcaça, mortalidade ou custos do tratamento. Embora seja conhecido o agente patogênico causador ainda há muito a ser elucidado em relação aos genes envolvidos na patogenicidade e, até mesmo, quais os melhores métodos de diagnóstico (MEHAT et al, 2021).

O conhecimento e a caracterização de APEC dos maiores estados produtores de aves são dados importantes para que se compreenda a epidemiologia da doença e se determine quais as linhagens estão associadas ao aumento do número de casos de colibacilose, com base nos conhecimentos acumulados nos últimos anos (NOLAN et al, 2020).

No Brasil, alguns sorogrupos de APEC foram identificados, como em surtos com canários, em que foram responsáveis *E. coli* O117:H4, principalmente, e O1:H20. Em aves comerciais, os trabalhos mais recentes relataram ocorrência de O6-B2-ST73, bem como casos envolvendo O88, O25, O12 e O45 em quadros clínicos de osteomielites vertebral e artrites, também em frangos. No presente estudo não foram identificados todos os sorogrupos de APEC, mas foi possível verificar a presença dos sorogrupos O2 e O78, considerados os dois de maior impacto em relatos anteriores (BRAGA et al, 2016; CUNHA et al, 2017; KIMURA et al, 2021).

O MLST tornou-se um dos métodos de diagnóstico epidemiológico de grande valor na tomada de decisão para o controle da colibacilose e a predição dos principais STs na avicultura, por PCR, poderá auxiliar na determinação da circulação de linhagens com maior potencial patogênico, de forma rápida e com custos menores (JOHNSON et al, 2022).

Existem STs que são relacionados principalmente aos animais, outros que são relacionados a humanos e também aos dois, mostrando a possibilidade zoonótica de algumas linhagens. Há linhagens em que são encontrados em aves e outros animais, em diarreias, como ovelhas, suínos e cães. Assim como, ST-131, ST-95 e ST-23 são correlacionadas a doenças humanas, como sua

patogenia no sistema urinário e infecções sanguíneas. (SUN et al, 2023; ZHAO et al, 2022; ABRAHAM et al, 2018; PITOUT&FINN, 2020; KIM et al, 2022).

Quando relacionados a este estudo, podemos detectar STs importantes na cadeia da avicultura sendo detectados em um dos principais estados produtores do país, o Paraná, com isolados positivos para ST-23, ST-117 e ST-95. Porém, um outro estado de suma importância é o Rio Grande do Sul, com detecção de ST-73 e ST-131. Estes dados sugerem a existência de variações regionais na presença de STs importantes em aves e também potencialmente zoonóticos.

Um fator limitante deste estudo foi a amostragem diminuta em alguns estados, como São Paulo, uma vez que elas foram obtidas por conveniência e sem uma prévia padronização amostral. No estado de São Paulo não há uma queixa relacionada com o aumento das condenações em abatedouros, como ocorre atualmente nos estados de Minas Gerais e Paraná. Mas a exclusão da circulação das linhagens ST-23, ST-117, ST-95, ST-73 e ST-131 no estado necessita da avaliação de um número maior de APEC. Há necessidade de ampliar a detecção destes clones de maior risco em outros estados produtores, para determinação e consolidação de um perfil epidemiológico no futuro.

As linhagens de alto risco e de maior impacto na colibacilose aviária são as pertencentes ao filogrupo G, pois foram recentemente relacionadas a surtos com mortalidade elevada e resistência a antibióticos. Há muitos estudos anteriores que correlacionam o filogrupo B2 a patogenicidade leve, média e alta de isolados, entretanto, estes precisam ser melhor avaliados, pois o filogrupo G foi descrito recentemente e, anteriormente, estava dentro do grupo B2 e F (CLERMONT et al, 2019; ROCHA et al, 2020). Os resultados deste estudo destacaram o predomínio do grupo G nos estados avaliados, seguido por B2, confirmando os dados de literatura.

A resistência antimicrobiana é um dos motivos de atenção na produção avícola atualmente, com a necessidade de rastreamento em toda a cadeia, pois a presença em *E. coli* comensais, provenientes de cloaca, mecônio, água, alimento e em cascudinhos, podem apresentar genes de resistência como *fosA3*

e *bla_{ctx-m-55}*, servindo de sentinelas para avaliação do risco da presença de bactérias resistentes e patogênicas (MENCK-COSTA et al, 2022).

Neste estudo também foi investigada a resistência a antimicrobianos, a qual alcançou 55,55% (n=35/63) de multirresistência. O fato de não haver um antibiótico que apresente sensibilidade a todos os isolados acende um alerta. Em 2018, segundo Oliveira et al (2022), as estirpes de APEC demonstravam 48% de multirresistência, e os autores observaram também o maior número de resistência para amoxicilina, tetraciclina e doxicilina.

Há também isolados provenientes em lesões de celulite encontrados em um frigorífico no norte do Paraná em que foram detectados resistência a diversos antimicrobianos, como ampicilina, ceftiofur, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetropim e enrofloxacin, assim, também há uma grande porcentagem de multirresistência, chegando a 72,7%, sendo os mesmos encontrados em maior número neste estudo. Esse não é um problema enfrentado apenas no Brasil, mas sim, mundialmente, como na Jordânia, em que há semelhanças, como resistência aos mesmos antibióticos comentados anteriormente, mas também a doxicilina e espectomicina, embora estes também já tenham sido relatados aqui (KANABATA et al, 2019; IBRAHIM et al, 2019).

Foi observada uma diminuição no número de isolados que apresentaram multirresistência e resistência a amoxicilina, ampicilina, neomicina, flumequime, cotrimoxazol, florfenicol e lincospectina, embora ainda seja uma pequena quantidade, pode ser um indício que as novas práticas e alternativas ao uso do antibiótico esteja fazendo efeito, embora um resultado satisfatório seja observado apenas com a redução de uso em longo prazo (OLIVEIRA et al, 2022).

7 CONCLUSÃO

Embora existam muitas lacunas no estudo de *Escherichia coli* patogênica para aves no Brasil, os dados deste estudo permitem concluir que:

- A multirresistência continua sendo um problema a ser solucionado na cadeia da avicultura.
- Os filogrupos G e B2 predominaram em isolados virulentos de APEC.
- Os sorogrupos O1, O2, O53 e O78 puderam ser identificados por tipagem molecular e soroaglutinação rápida e representaram 19% do total, com predomínio de O2 e O78. Um percentual significativo de APEC não foi identificado por esta ferramenta, indicando a necessidade de um estudo mais abrangente para determinar outros sorogrupos nestes estados.
- Os principais STs de alto risco foram identificados nos isolados analisados, e, ainda que em baixa porcentagem, demonstraram o risco potencial de ocorrência de casos mais graves de colibacilose aviária.
- Há uma aparente variação regional na distribuição das linhagens de alto risco, mostrando a necessidade de um estudo mais amplo para compreender quais são os STs atuais de mais importância no Brasil.
- A epidemiologia da doença pode ser estabelecida pela combinação das técnicas moleculares de sorotipagem, determinação de filogrupos e pesquisa de STs de alto risco, servindo de base para a utilização de vacinas no campo.

REFERÊNCIAS

ABPA. Relatório Anual 2022. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2022.

ABRAHAM, S.; KIRKWOOD, R.N.; LAIRD, T.; SAPUTRA, S.; MITCHELL, T.; SINGH, M.; LINN, B.; ABRAHAM, R.J.; PANG, S.; GORDON, D.M.; TROTT, D.J.; O'DEA, M. Dissemination and persistence of extended-spectrum cephalosporin-resistance encoding IncI-bla_{CTXM-1} plasmid among *Escherichia coli* in pigs. **The ISME Journal**, v. 12, p. 2352-2362, 2018.

APOSTALOKOS, I.; LACONI, A.; MUGHINI-GRAS, L.; YAPICIER, O. S.; PICCIRILLO, A. Occurrence of Colibacillosis in Broilers and Its Relationship with Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Population Structure and Molecular Characteristics. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, n.737720, p. 1-13, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.737720.

BRAGA, J.F.V.; CHANTELOUP, N.K.; TROTTEREAU, A.; BAUCHERON, S.; GUABIRABA, R.; ECCO, R.; SCHOULER, C. Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. **BMC Vet Res**, v. 12, n.140, 2016. DOI: 10.1186/s12917-016-0762-0.

CHRISTENSEN, H.; BACHMEIER, J.; BISGAARD, M. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, 2021. DOI: 10.1080/03079457.2020.1845300.

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, 2013. DOI: 10.1111/1758-2229.12019.

CLERMONT, O.; DIXIT, O.V.A.; VANGCHHIA, B.; CONDAMINE, B.; DION, S.; BRIDIER-NAHMIAS, 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 Reports**, v. 0, n. 0, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1111/1462-2920.14713.

CLSI. Approved standard: M02-A12 - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018

CUNHA, M.P.V.; SAIDENBERG, A.B.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; VIEIRA, M.A.M.; GOMES, T.A.T.; KNÖBL, T. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **PLoS ONE**, v.12, n.6, p.1-11, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178970.

DOUMITH, M.; DAY, M.; CIESIELCZUK, H.; HOPE, R.; UNDERWOOD, A.; REYNOLDS, R.; WAIN, J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 160-166, 2015. DOI: 10.1128/JCM.02562-14.

EID, S.; TOLBA, H.M.N; HAMED, R.I.; AL-ATFEEHY, N.M. Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol Against emerging multidrug resistant *E. coli* in broilers. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p.3380-3389, 2022. DOI: 101016/j.sjbs.2022.02.015.

EWERS, C.; JANSSEN, T.; WIELER, L.H. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Berliner und Munchener Tierazliche Wochenschrift**, v.116, p. 381-395, 2003. PMID: 14526468.

FOSTER, N.; TANG, Y.; BERCHIERI, A.; GENG, S.; JIAO, X.; BARROW, P. Revisiting Persistent *Salmonella* Infection and the Carrier State: What Do We Know?. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1299, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10101299.

EWING, W.H. 1986. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th edn. Elsevier, Amsterdam. 1–536.

HAN, Y.; LIU, Q.; WILLIAS, S.; LIANG, K.; LI, P.; CHENG, A.; KONG, Q.; A bivalent vaccine derived from *Salmonella* expressing O-antigen polysaccharide provides protection Against avian pathogenic *Escherichia coli* O1 and O2 infection. **Vaccine**, v.36, p.1038-1046, 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.01.36.

IBRAHIM, R.A.; CRYER, T.L.; LAFI, S.Q.; BASHA, E.; GOOD, L.; TARAZI, 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. 159, 2019.

IGUCHI, A.; IYODA, S.; SETO, K.; MORITA-ISHIHARA, T.; SCHEUTZ, F.; OHNISHI, M. Escherichia coli O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p.2427-2432, 2015. DOI: 10.1128/JCM.00321-15.

JOHNSON, T.J.; MILLER, E. A.; FLORES-FIGUEROA, C.; MUNOZ-AGUAYO, J.; CARDONA, C.; FRANSEN, K.; LIGHTY, M.; GONDER, E.; NEZWORSKI, J. Refining the definition of the avian pathogenic Escherichia coli (APEC) pathotype through inclusion of high-risk clonal groups. **Poultry Science**, v. 101, n. 102009, 1-13, 2022. DOI: 10.1016/j.psj.2022.102009.

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. 3887-3996, 2008. DOI: 10.1128/JCM.00816-08.

KANABATA, B.; MENCK-COSTA, M.P.; SOUZA, M.; JUSTINO, L.; RANGEL, I. G.; KOBAYASHI, R.L.T.; NAKAZATO, G.; BAPTISTA, A.A.S. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Strains of Escherichia coli isolated from Avian Cellulitis Lesions. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 21, n. 3, p. 001-006, 2019. DOI: 10.1590/1806-9061-2019-0981.

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. 467, p. 1-32, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10040467.

KIM, B.; KIM, J.; LEE, Y. Virulence Factors associated with *Escherichia coli* bacteremia and urinary tract infection. **Ann Lab Med**, v.42, n.2, p. 203-212, 2022. DOI: 10.3343/alm.2022.42.2.203.

KIM, J.; LEE, H.; JEONG, O.; KIM, D.; JEONG, J.; KWON, Y.; KANG, M. High prevalence and Variable fitness of fluoroquinolone-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from chickens in Korea. **Avian Pathology**, 2020. DOI: 10.1090/03079457.2020.1855322.

KIMURA, A.H.; KOGA, V.L.; GAZAL, L.E.S.; BRITO, B.G.; BRITO, K.C.T.; NAVARRO-OCAÑA, A.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R.K.T. Characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli: an outbreaks in canaries. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p.1005-1012, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00443-0.

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 na antimicrobial resistance Properties. **Poultry Sciences**, v. 100, n. 100903, p.1-12, 2021. DOI: 10.1016/j.psj.2020.11.072.

MANGES, A.R.; GEUM, H.M.; GUO, A.; EDENS, T.J.; FIBKE, C.D.; PITOUT, J.D.D. Global extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p.1-25, 2019. DOI: 10.1128/CMR.00135-18.

MASSELLA, E.; REID, C.J.; CUMMINS, M.L.; ANATANAWAT, K.; ZINGALI, T.; SERRAINO, A.; PIVA, S.; GIACOMETTI, F.; DJORDJEVIC, S.P. Snapshot study of Whole genome sequences of *Escherichia coli* from healthy companion animals, livestock, wildlife, humans, and food in Italy. **Antibiotics**, v. 9, n. 782, p. 1-22, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9110782.

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, 2021. DOI: 10.1080/03079457.2021.1915960.

MILLAN, A.S. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 12, p.978-985, 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.06.007.

MENCK-COSTA, M.F.; BAPTISTA, A.A.S.; GAZAL, L.E.S.; JUSTINO, L.; SANCHES, M.S.; SOUZA, M.; NISHIO, E.K.; DOS SANTOS, B.Q.; CRUZ, V.D.; BERBERT, J.V.M.; GONÇALVES, B.C.; ANDRADE, G.; VESPERO, E.C.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R.K.T. High-frequency detection of *fosA3* and *bla_{ctx-m-55}* genes in *Escherichia coli* from longitudinal monitoring in broiler chicken farms. **Frontiers in Microbiology**, v.18, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.84611.

NICOLAS-CHANOINE, M.; BERTRAND, X.; MADEC, J. *Escherichia coli* ST131, na intrigal clonal group. **Clinical Microbiology Review**, v. 27, n. 3, p.543-574, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00125-13.

NOLAN, L.K. et al. **Diseases of Poultry**. 14 ed. John Wiley & Sons, Inc,2020, p. 770-830.

OLIVEIRA, J.M.; CARDOSO, M.F.; MOREIRA, F.A.; MÜLLER, A. Phenotypic antimicrobial resistance (AMR) of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler breeder flocks between 2009 and 2018. **Avian Pathology**, v. 51, n.4, p. 388-394, 2022. DOI: 10.1080/03079457.2022.2074816.

PITOUT, J.D.D.; FINN, T.J. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 81, 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104265.

QUEL, N.G.; ARAGÃO, A.Z.B.; SALVADORI, M.R.; FARIAS, A.S.; JOAZEIRO, P.P.; SANTOS, L.M.B.; SÁ, L.R.M.; FERREIRA, A.J.P.; YANO, T. Cellulitis lesions in broiler chicken are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). **Veterinary Microbiology**, v. 162, n.2-4, p. 866-872, 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.11.007.

RODEROVA, M.; HALOVA, D.; PAPOUSEK, I.; DOLEJSKA, M.; MASARIKOVA, M.; HANULIK, V. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.2147, p.1-12, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02147.

ROCHA, D.T.; SALLE, F.O.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; NASCIMENTO, V.P.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): characterization and comparison. **The journal of infection in developing countries**, v.15, n. 7, p. 962-971, 2020. DOI: 10.3855/jidc.14217.

SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v.11, n. 10, 2019.

SUN, L.; MENG, N.; WANG, Z.; HONG, J.; DAI, Y.; WANG, Z.; WANG, J.; JIAO, X. Genomic characterization of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in stray dogs sheltered in Yangzhou, China. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p.7741-7750, 2023.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.207-217, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2298.

TOHMAZ, M.; BADOUEI, M.A.; RAHMANI, H.K.; TABAR, G.H. Antimicrobial resistance, virulence associated genes and phylogenetic background versus plasmid replicon types: the possible associations in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 421, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1186/s12917-022-03496-x.

VALAT, C.; DRAPEAU, A.; BEURLET, S.; BACHY, V.; BOULOUIS, H.; PIN, R.; CAZEAU, G.; MADEC, J.; HAENNI, M. Pathogenic *Escherichia coli* in dogs reveals the predominance of ST372 and the human-associated ST73 extra-intestinal lineages. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 580, p. 1-12, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00580.

VOGADO, G.M.S.; VOGADO, K.T.S.; FONSECA, W.J.L.; VOGADO, W.F.; OLIVEIRA, A.M.; OLIVEIRA, N.M.; LUZ, C.S.M. Evolução da Avicultura Brasileira. **Nucleus Animalium**, v. 8, n. 1, p. 49-58, 2016. DOI: 10.3738/21751463.1682.

XIA, F.; JIANG, M.; WEN, Z.; WANG, Z.; WANG, M.; XU, Y.; ZHUGE, X.; DAI, J. Complete genomic analysis of ST117 lineage extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) to reveal multiple genetic determinants to drive its global transmission: ST117 *E. coli* as an emerging multidrug-resistant foodborne ExPEC with zoonotic potential. **Transbound Emerg Disease**, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14678.

ZHAO, X.; ZHAO, H.; ZHOU, Z.; MIAO, Y.; LI, R.; YANG, B.; CAO, C.; XIAO, S.; WANG, X.; LIU, H.; WANG, J.; YANG, Z. Characterization of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolates that cause diarrhea in sheep in Northwest China. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.01595-22.