



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

GABRIELA ALEXANDRE STEVANATO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp.
FRENTE A ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA**

Londrina
2025

GABRIELA ALEXANDRE STEVANATO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp.
FRENTE A ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Angelita S. Baptista

Londrina

2025

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

S843 Stevanato, Gabriela Alexandre.
 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp. FRENTE A ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA / Gabriela Alexandre Stevanato. - Londrina, 2025.
 55 f. : il.

 Orientador: Ana Angelita Sampaio Baptista.
 Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2025.
 Inclui bibliografia.

 1. APEC - Tese. 2. Probiótico - Tese. 3. Virulência - Tese. 4. Resistência - Tese. I. Baptista, Ana Angelita Sampaio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

CDU 619

GABRIELA ALEXANDRE STEVANATO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp.
FRENTE A ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Angelita S. Baptista
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Alais Maria Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2025.

“Não há nada a temer na vida, apenas tratar de compreender”.
Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por me conceder força, sabedoria e perseverança para concluir esta etapa tão significativa da minha jornada acadêmica.

À minha **orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Angelita Sampaio Baptista** e pela orientação, dedicação para com as minhas dificuldades e compartilhamento de conhecimento. Sou profundamente grata pela paciência que teve durante essa jornada. A sua calma e confiança em mim foram essenciais em meu percurso e em minha vida. Sou muito grata!

Agradeço à **Universidade Estadual de Londrina (UEL)**, ao **Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias** pela oportunidade de aprendizado, permitindo acesso a uma formação diferenciada potencializando a capacidade empreendedora e formadora de opinião.

Além disso, minha sincera gratidão aos **Professoras (es), Doutoradas (es) das bancas examinadoras** da qualificação e da defesa final, que, com suas contribuições e sugestões valiosas, enriqueceram este trabalho e ampliaram minha visão acadêmica e profissional.

Aos meus amigos do **Laboratório de Medicina Aviária** da Universidade Estadual de Londrina, que me acolheram como se eu fizesse parte há muitos anos e me tornaram parte dessa família maravilhosa e feliz. Vocês se fizeram presente em todos os momentos do estudo. Admiro muito todos vocês, desejo todo sucesso do mundo e obrigada por tanto.

Ao meu **noivo Elison**, agradeço imensamente por estar ao meu lado me incentivando, torcendo por mim e me ajudando todos os dias a me dedicar 1% nessa jornada.

Aos meus **pais Heverson e Leonilda**, ao meu **irmão Guilherme**, por se fazer presente em todas as dificuldades. Vocês me educaram com amor, se dedicaram à minha educação como ser humano, me deram amor. Vocês fizeram de mim a pessoa que sou hoje, e eu só tenho motivos para agradecer.

Muito obrigada a todos!

STEVANATO, G. A. **Avaliação do Efeito Antagonista de *Lactobacillus* spp. frente a isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária.** 2025. 54 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025

RESUMO

A colibacilose aviária, causada por *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC), representa um desafio significativo para a avicultura, impactando a produtividade e resultando em prejuízos econômicos. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos, perfil genotípico de virulência, identificar *sequence typing*, avaliar o efeito antagonista de cepas comerciais de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de APEC e desenvolver um material complementar educacional sobre colibacilose aviária. Para isso, foram selecionadas 38 isolados de APEC da bacterioteca do Laboratório de Medicina Aviária (LMA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) isoladas de matrizes de frango de corte com quadro de colibacilose. Para tanto foram realizados os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, determinação de genes de virulência e identificação dos *sequence typing* por *Polimerase chain reaction* (PCR), avaliação do efeito antagonista do *pool* de *Lactobacillus* spp. comercial contra os isolados de APEC pela técnica *spot on the lawn* e elaboração de mapas mentais utilizando a plataforma *Canva*. Os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram resistência ao ácido nalídixico 29/38 (76,32%), tetraciclina e enrofloxacina 17/38 (44,74%), bem como, ciprofloxacina 13/38 (34,21%), ampicilina 10/38 (26,32%), sulfa+trimetoprim 3/38 (7,89%), seguido por gentamicina, fosfomicina e cloranfenicol apresentaram 1/38 (2,63%). Menor número de isolados 21,05% (8/38) apresentou perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR) e todos os isolados eram negativos para ESBL. Observou-se que os isolados apresentaram positividade para os genes de virulência *ompT*, *hlyF* e *iss* 97,36% (37/38), 94,73% (36/38) e 84,21% (32/38) respectivamente. Já para os genes de virulência *iutA* e *iroN*, foram observados a presença em 78,94% (30/38) e 81,57% (31/38) dos isolados. No que tange a identificação do perfil de ST, observou-se que 21,05% (8/38) com sendo ST131, 2,63% (1/38) sendo ST23 e 76,32% (29/38) não foi possível determinar. A média dos halos de inibição bacteriana foram de 5,61 mm, e frente a dois isolados (ID: 2953 e 3005) de ST131 foi de 8,5 mm e 8 mm de atividade inibitória. A coletânea de mapas mentais sobre a colibacilose aviária foi utilizada como recurso acessível e funcional contribuindo para tomada de decisão por profissionais da avicultura. Conclui-se que o uso de probióticos foi capaz de inibir APEC com perfil de resistência a antimicrobianos e MDR, assim como atuar frente a possíveis clones de alto risco (ST131) para a produção avícola.

Palavras-chave: colibacilose, virulência, probiótico, antimicrobiano, antagonismo

STEVANATO, G. A. **Evaluation of the antagonistic effect of *Lactobacillus* spp. against avian pathogenic *Escherichia coli* isolates.** 2025. 54 p. Dissertação (Mestrado Profissional Em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025

ABSTRACT

Avian colibacillosis, caused by Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), represents a significant challenge for poultry farming, impacting productivity and resulting in economic losses. The present study aimed to characterize the phenotypic profile of antimicrobial resistance, genotypic profile of virulence, identify *sequence typing*, evaluate the antagonistic effect of commercial strains of *Lactobacillus* spp. against APEC isolates and develop complementary educational material on avian colibacillosis. For this, 38 APEC isolates from the bacteriothèque of the Laboratory of Avian Medicine (LMA) of the State University of Londrina (UEL) were selected, isolated from broiler breeders with colibacillosis. For this purpose, antimicrobial susceptibility tests, determination of virulence genes and identification of sequence typing by Polymerase chain reaction (PCR), evaluation of the antagonistic effect of the pool of *Lactobacillus* spp. commercial against APEC isolates by the spot on the lawn technique and creation of mind maps using the Canva platform. The results of the antimicrobial susceptibility test showed resistance to nalidixic acid 29/38 (76.32%), tetracycline and enrofloxacin 17/38 (44.74%), as well as ciprofloxacin 13/38 (34.21%), ampicillin 10/38 (26.32%), sulfa + trimethoprim 3/38 (7.89%), followed by gentamicin, fosfomycin and chloramphenicol presented 1/38 (2.63%). A smaller number of isolates 21.05% (8/38) presented a multidrug resistance (MDR) profile and all isolates were negative for ESBL. It was observed that the isolates presented positivity for the virulence genes *ompT*, *hlyF* and *iss* 97.36% (37/38), 94.73% (36/38) and 84.21% (32/38) respectively. As for the virulence genes *iutA* and *iroN*, the presence was observed in 78.94% (30/38) and 81.57% (31/38) of the isolates. Regarding the identification of the ST profile, it was observed that 21.05% (8/38) were ST131, 2.63% (1/38) were ST23 and 76.32% (29/38) could not be determined. The mean bacterial inhibition halos were 5.61 mm, and against two isolates (ID: 2953 and 3005) of ST131 were 8.5 mm and 8 mm of inhibitory activity. The collection of mental maps on avian colibacillosis was used as an accessible and functional resource contributing to decision-making by poultry farming professionals. It is concluded that the use of probiotics was able to inhibit APEC with antimicrobial resistance and MDR profile, as well as act against possible high-risk clones (ST131) for poultry production.

Keywords: colibacillosis, virulence, probiotic, antimicrobial, antagonism

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
BHI	Infusão cérebro coração
CLSI	Instituto de padrões clínicos e laboratoriais
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MDR	Resistência múltipla a drogas
MLST	Tipagem por sequenciação de múltiplos
MPEC	<i>E. coli</i> patogênica mamária
MRS	<i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
mm	Milímetro
NMEC	<i>E. coli</i> associadas a meningites neonatais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SEPEC	<i>E. coli</i> causadoras de septicemia
ST	Tipagem de sequências
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênicas
VAGs	Genes associados à virulência
WGS	Sequenciamento completo do genoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos dos isolados de APEC $n=38$...	36
Figura 2. Diâmetro dos halos (mm) de inibição do <i>Lactobacillus</i> spp. frente aos isolados de APEC provenientes de lesões de colibacilose em matrizes de frango de corte.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação dos genes de virulência de isolados de <i>E. coli</i>	30
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores para identificar sequence typing ST23, ST131, ST355_1, ST355_2, ST117, ST428 e O78 de isolados de <i>E. coli</i>	32
Tabela 3. Perfil do <i>sequence typing</i> e genes de virulência (<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>) dos isolados de APEC de quadros de colibacilose em matrizes de frango de corte.	34
Tabela 4. Produção de ESBL, resistência múltipla a droga (MDR) e classes de antimicrobianos dos isolados de APEC ($n=38$) de quadros de colibacilose em matrizes de frango de corte.	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO:	16
2.1 REFERÊNCIAS	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 ARTIGO CIENTÍFICO	26
4.1 INTRODUÇÃO	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Isolados bacterianos	28
5.2 Sensibilidade aos antimicrobianos	28
5.3 Produção de β -lactamase de espectro estendido	28
5.4 Extração de DNA e detecção dos genes de virulência	29
5.5 Identificação de <i>Sequence Typing</i>	31
5.6 <i>Spot on the lawn</i>	33
6 RESULTADOS	34
7 DISCUSSÃO	39
8 CONCLUSÃO	42
9 REFERÊNCIAS	43
10 PRODUÇÃO TECNOLÓGICA.....	48
11 CONCLUSÕES	55

1 INTRODUÇÃO

A avicultura desempenha um papel fundamental na economia global, sendo um dos setores mais relevantes para a segurança alimentar e o desenvolvimento econômico. Segundo relatório mais recente da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) no ano de 2023 o Brasil se destaca-se nesse cenário como o segundo maior produtor mundial de frango de corte, com uma produção de 14.833 mil toneladas, representando 14,5% da produção global, além disso, o país lidera as exportações de carne de frango, atingindo um volume de 5.139 mil toneladas, o que corresponde a 37,9% das exportações mundiais. Esse desempenho expressivo é sustentado por uma estrutura produtiva robusta, evidenciada pelo alojamento de 60.963.508 matrizes de linhagem de corte.

Quando estratificados os dados segundo relatório recente da ABPA (2024), observa-se que o estado do Paraná desempenha um papel central na produção avícola nacional, sendo responsável pelo maior número de abates no Brasil, totalizando 2.090 milhões de cabeças, o que equivale a 39,47% do total de 5.296 bilhões de aves abatidas no país. Além disso, o Paraná também lidera o *ranking* da criação de frangos de corte, respondendo por 41,7% da produção nacional.

O patotipo APEC pertence ao grupo de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), esse possui outros patotipos como NMEC (*Escherichia coli* meningite neonatal), UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica), SEPEC (*Escherichia coli* causadora de septicemia), MPEC (*Escherichia coli* patogênica mamária) e demonstram similaridade genética entre as amostras de aves e humanos, sugerindo risco zoonótico (Ha *et al.*, 2023), quando compara-se as sequências dominantes levanta-se a hipótese de que APEC pode colonizar o cólon humano por meio da ingestão de aves contaminadas e, então, atingir o sistema urinário (Saidenberg *et al.*, 2020).

O sequenciamento de genoma completo, *Whole Genome Sequencing* (WGS) e a tipagem molecular por MLST (*Multilocus Sequence Typing*) têm sido extremamente empregados para a identificação de tipagem de sequência (ST). Essa abordagem permite a avaliação de sequências de múltiplos genes conservados em diferentes patotipos (Johnson *et al.*, 2022). O sistema MLST analisa entre sete e dez genes constitutivos, essenciais para a manutenção das funções celulares, como *adK*,

fumC, *gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA* e *trpA* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (Clermont *et al.*, 2013).

O crescimento acelerado da produção avícola trouxe desafios significativos para a sanidade animal, com destaque para infecções bacterianas como a colibacilose, causada por *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) (Mehdi *et al.*, 2018), responsável por elevados índices de mortalidade, podendo atingir de 10% a 15% nos casos de sepse (Landman *et al.*, 2015), além de impactar os níveis de produtividade, gerar perdas econômicas e aumentar os custos com tratamento (Nolan *et al.*, 2019), a dificuldade no controle da infecção por APEC deve-se, em grande parte, à presença de um conjunto de genes de virulência que conferem a esse patógeno uma elevada capacidade de adaptação e sobrevivência no hospedeiro (Varga *et al.*, 2018).

A transmissão de APEC ocorre por via horizontal, por fômites contaminados, e por via vertical, da matriz infectada para a progênie, facilitando a disseminação do patógeno no plantel (Joseph *et al.*, 2023), resultando em infecções localizadas ou sistêmicas que comprometem tecidos e órgãos, causando perihepatite, aerossaculite, pericardite, salpingite, coligranuloma, onfalite, celulite e osteomielite/artrite, impactando a saúde das aves e a eficiência produtiva do sistema avícola (Peng *et al.*, 2019).

Uma crescente resistência antimicrobiana observada em cepas desse patógeno reforça a necessidade de estratégias alternativas e sustentáveis para seu manejo (Zamojska *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente estudo foi estruturado em três capítulos, cada um representando um produto tecnológico voltado para o enfrentamento dos desafios fiscais pela APEC na avicultura, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no controle da colibacilose.

O primeiro capítulo consiste em uma revisão de literatura publicada na revista técnica "Mundo Agro", abordando os aspectos mais relevantes da APEC e suas implicações na produção avícola. No segundo capítulo está apresentado um artigo científico que foi realizado com objetivo de caracterizar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos, perfil genotípico de virulência, identificar *sequence typing* e avaliar o efeito antagonista de cepas comerciais de *Lactobacillus* spp. frente a amostras de APEC. Por fim, no terceiro capítulo está apresentado um *e-book* intitulado "Coletânea de Mapas Mentais: colibacilose aviária", direcionado a médicos

veterinários e demais profissionais que atuam na avicultura, como uma ferramenta de educação continuada.

2 REVISÃO:

Produto tecnológico: Artigo publicado em revista técnica “Mundo Agro”, acesso através do portal AviSite, na edição de dezembro de 2024, nº 6, ano III, pag. 28 a 30. ISSN 1983-0017.

APEC: UM DESAFIO PARA A INDÚSTRIA AVÍCOLA E SEU POTENCIAL ZOONÓTICO

A indústria avícola obteve um expressivo progresso em seu sistema de produção nos últimos anos, impulsionado por melhorias na genética, nutrição, ambiência, sanidade e gerenciamento da produção. A carne de aves destaca-se como uma das principais fontes de proteína animal, atendendo a crescente demanda global (Schmidt *et al.*, 2018).

O sistema intensivo de produção avícola otimiza e impulsiona o desenvolvimento do setor, elevando a produtividade e fortalecendo o mercado. No entanto, esse modelo também aumenta a exposição e a disseminação de patógenos, agravando os desafios sanitários (Mehdi *et al.*, 2018). Nos últimos anos, a indústria avícola enfrentou um surto significativo de aerossaculite em frangos de corte, associada a colibacilose e bronquite infecciosa das galinhas (Trevisol *et al.*, 2022).

Nas aves a colibacilose é uma doença infecciosa causada por *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) (Jørgensen *et al.*, 2017), acomete diversas espécies de aves com diferentes idades, causando infecções que podem ser localizadas ou sistêmicas (Kathayat *et al.*, 2021), proporcionando elevada morbidade e mortalidade e significativos prejuízos à indústria avícola em todo o mundo (Hu *et al.*, 2022). As principais manifestações clínicas da colibacilose aviária são peritonite, salpingite, infecção do saco vitelínico, celulite, colisepticemia, pericardite, aerossaculite, coligranuloma e artrite (Joseph *et al.*, 2023).

E. coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Este microrganismo possui flagelos que conferem motilidade, além de fímbrias ou *pili* que facilitam a adesão, e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos composta por antígeno somático (O) capaz de gerar proteção a células de defesa do hospedeiro (Nawaz *et al.*, 2024).

E. coli está amplamente distribuída na natureza e faz parte da microbiota entérica de animais e humanos (Santos *et al.*, 2018). No entanto, algumas cepas se diferenciam das comensais por codificarem fatores de virulência específicos,

tornando-se capazes de causar doenças (Pokharel *et al.*, 2023).

O patotipo APEC pertence ao grupo de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), sendo um importante conjunto que inclui outros patotipos, como NMEC, UPEC, MPEC e SEPEC associados em casos de meningite infantil, infecções do sistema urinário, mastite bovina, bem como, de septicemia (Sora *et al.*, 2021).

Essa característica é sustentada por semelhanças filogenéticas e genotípicas entre alguns subconjuntos de APEC e amostras humanas de ExPEC, sugerindo que APEC pode atuar como reservatório de genes de virulência e resistência a antimicrobianos, que podem ser disseminados na microbiota humana por meio de alimentos contaminados (Hornsey *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2017).

APEC é conhecida por carrear um conjunto significativo de genes associados à virulência (VAGs), alguns reconhecidos por facilitar a invasão de células epiteliais e a sobrevivência em aves, permitindo que o microrganismo seja capaz de disseminar-se do local inicial de colonização para outros órgãos (Cummins *et al.*, 2019).

A caracterização molecular de APEC é complexa e passou por revisões conforme descrito em Johnson *et al.* (2022) que propuseram um esquema de tipagem para APEC de alto risco quando a detecção de um isolado pertence a ST conhecido de alta virulência, ter a presença de genes virulência, por meio da posse de *hlyF* e *ompT*.

Nos últimos anos, tem-se utilizado o sequenciamento de genoma completo, *whole genome sequencing* (WGS) e a tipagem molecular por MLST (*Multilocus Sequence Typing*) para realizar a determinação do *sequence typing* (ST). Esse método permite a análise de sequências de diversos genes conservados em diferentes isolados bacterianos (Johnson *et al.*, 2022). O sistema MLST examina de sete a dez genes constitutivos (necessários para a manutenção de funções celulares básicas), como por exemplo *adK*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA* e *trpA* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), escolhidos pela sua estabilidade e ampla presença em cepas de *E. coli*.

A linhagem ST131 é amplamente reconhecida por sua relevância clínica em infecções humanas, especialmente devido à sua resistência a múltiplos antimicrobianos. Embora comumente associada a infecções em humanos, a ST131 também pode ser encontrada em animais (Saidenberg *et al.*, 2020). Além disso, estudos de Lozica *et al.* (2021) demonstraram que as linhagens ST131, ST117 e ST95

possuem alta prevalência em isolados de matrizes de frango de corte, estando especialmente relacionadas a casos de salpingite.

Estudos sobre o potencial zoonótico da ST131 em aves indicam que essas cepas podem representar um risco à saúde pública devido à sua resistência a antimicrobianos e à presença de genes de virulência semelhantes aos encontrados em cepas humanas. Isso sugere que as aves podem atuar como reservatórios de cepas *E. coli*, contribuindo para a disseminação de infecções entre animais e humanos (Forde *et al.*, 2019; Saidenberg *et al.*, 2020).

A linhagem ST117 está associada a cepas altamente virulentas, capazes de promover infecção de sistema urinário humano e sepse (Cummins *et al.*, 2022; Saidenberg *et al.*, 2024), essa característica reforça a importância de investigar e identificar tais cepas na produção avícola.

No que tange a tipagem baseada no antígeno somático, as cepas do sorogrupo O78 de *E. coli* patogênica para aves mostram similaridade genética entre as amostras de aves e humanos, sugerindo a possibilidade de transmissão entre espécies (Ha *et al.*, 2023). A presença de genes de resistência em cepas aviárias indica risco de transmissão a humanos, ressaltando a importância de monitoramento e manejo adequados para prevenir surtos e proteger a saúde pública (Mehat *et al.*, 2021).

Recentemente Nawaz *et al.* (2024) relataram que os sorogrupos de APEC predominantes na América do Sul são: O1, O2, O6, O55, O78, O157, O111, O114, O119, O124 e O148 os quais também foram associados a infecções extraintestinais em humanos, destacando a conexão entre a saúde animal e humana.

Os genes de virulência presentes em APEC são determinantes para a sua capacidade de causar doenças. Esses estão envolvidos em processos como a adesão às células hospedeiras (*fimH*, *papC*, *tsh*), evasão do sistema imunológico (*kpsM*, *iss*, *ompT*), aquisição de nutrientes (*iroN*, *iucD*, *iuta*), produção de toxinas (*hlyF*, *astA*), formação de biofilmes (*SdiA*, *LuxS*, *Pfs*) e regulação de expressão gênica (*PhoPQ*, *BasSR*, *BarA-UvrY*) (Nolan *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2008; Barbieri *et al.*, 2013; Zuo *et al.*, 2019; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2020).

APEC era considerada um patógeno secundário, que causava surtos devido a imunossupressão por infecções virais concomitantes, práticas de manejo inadequadas ou higiene insuficiente dos ovos, no entanto, pesquisas recentes identificaram o seu papel potencial como patógeno primário capaz de causar doenças

graves e alta mortalidade na ausência de fatores imunossupressores (Karunaratna *et al.*, 2017; Newman *et al.*, 2021; Tönnemann *et al.*, 2024).

A transmissão de APEC pode ocorrer via horizontal por contato com ambiente, fômites, ração e água contaminados (Kathayat *et al.*, 2021). Já a via vertical resulta da infecção do sistema reprodutivo da fêmea que promoverá infecção do embrião, resultando em morte embrionária, nascimento de pintinhos com baixo índice zootécnico e maior predisposição a doenças (Giovanardi *et al.*, 2005, Poulsen *et al.*, 2017).

O controle da colibacilose na produção avícola fundamenta-se em práticas de biossegurança, enquanto o tratamento baseia-se na antibioticoterapia (Silva, 2018). Todavia, com o fenômeno de resistência bacteriana aos antimicrobianos, a busca por métodos alternativos tem se tornado uma necessidade urgente, visando assegurar a eficácia do controle e a sustentabilidade da produção avícola (Joseph *et al.*, 2023). Abordagens como o uso de probióticos, prebióticos, bacteriófagos e vacinas têm se mostrado promissoras no controle da APEC (Nawaz *et al.*, 2024).

Investir em alternativas aos antimicrobianos, aprimorar práticas de biossegurança e ampliar a disseminação dos conhecimentos científicos são ações fundamentais para mitigar os riscos zoonóticos associados à APEC, protegendo tanto o setor avícola quanto a saúde pública.

2.1 REFERÊNCIAS

BARBIERI *et al.* Genotypes and Pathogenicity of Cellulitis Isolates Reveal Traits That Modulate APEC Virulence. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72322–e72322, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072322>.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**. 2013. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>.

CUMMINS, M. L. *et al.* Whole genome sequence analysis of Australian avian pathogenic *Escherichia coli* that carry the class 1 integrase gene. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 2, 2019. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000250>.

CUMMINS, M. L. *et al.* Plasmid Lineages in *Escherichia coli* ST95: Implications for Host Range, Antibiotic Resistance, and Zoonoses. **mSystems**, v. 7, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1128/msystems.01212-21>.

FORDE, B. M. *et al.* Population dynamics of an *Escherichia coli* ST131 lineage during recurrent urinary tract infection. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3643, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11571-5>.

GIOVANARDI, D. *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. **Avian Pathology**, v. 34, n. 4, p. 313–318, 2005. <https://doi.org/10.1080/03079450500179046>.

HA, E.-J. *et al.* Tracing the Evolutionary Pathways of Serogroup O78 Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1714–1714, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121714>.

HORNSEY, M. *et al.* Characterization of a colistin-resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* ST69 isolate recovered from a broiler chicken in Germany. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 111–114, 2019. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000882>.

HU, J. *et al.* Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049391>.

JOHNSON, T. P. *et al.* Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008. <https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>.

JOHNSON, J. R. *et al.* Extraintestinal Pathogenic and Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*, Including Sequence Type 131 (ST131), from Retail Chicken Breasts in the United States in 2013. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 6, 2017. <https://doi.org/10.1128/AEM.02956-16>.

JOHNSON, T. J. *et al.* Refining the definition of the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype through inclusion of high-risk clonal groups. **Poultry Science**, v. 101, n. 10, p. 102009, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102009>.

JØRGENSEN, S. L. *et al.* Chromosomal features of *Escherichia coli* serotype O2:K2, an avian pathogenic *E. coli*. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, 10, 2017. doi:10.1186/s40793-017-0245-3.

JOSEPH, J. *et al.* Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broiler Breeders with Colibacillosis in Mississippi. **Poultry**, v. 2, n. 1, p. 24–39, 2023. <https://doi.org/10.3390/poultry2010004><https://doi.org/10.3390/pathogens12111280>

KARUNARATHNA, R. *et al.* Increased Incidence of Enterococcal Infection in Nonviable Broiler Chicken Embryos in Western Canadian Hatcheries as Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Avian Diseases**, v. 61, n. 4, p. 472–480, 2017. <https://doi.org/10.1637/11678-052317-Reg.1>.

KATHAYAT, D. *et al.* Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 467, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>.

LOZICA, L. *et al.* Phylogenetic characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* strains longitudinally isolated from broiler breeder flocks vaccinated with autogenous vaccine. **Poultry Science**, v. 100, n. 5, p. 101079, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101079>.

MEHDI, Y. *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 170–178, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.

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. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1915960>.

NAWAZ, S. *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): current insights and future challenges. **Poultry Science**, v. 103, n. 12, p. 104359, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104359>.

NEWMAN, D. M. *et al.* Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from colibacillosis cases, 2018. **PeerJ**, v. 9, p. e11025, 2021. <https://doi.org/10.7717/peerj.11025>.

NOLAN, L. K. *et al.* **Diseases of Poultry**, 13th ed.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 751–785.

POKHAREL, P.; DHAKAL, S.; DOZOIS, C. M. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 344, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>.

POULSEN, L. L. *et al.* Longitudinal study of transmission of *Escherichia coli* from broiler breeders to broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 207, p. 13–18, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.029>.

SAIDENBERG, A. B. S. *et al.* mcr-Positive *Escherichia coli* ST131-H22 from Poultry in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1951–1954, 2020. <https://doi.org/10.3201/eid2608.191724>.

SAIDENBERG, A. B. S. *et al.* *Escherichia coli* ST117: exploring the zoonotic hypothesis. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 10, 2024. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00466-24>.

SCHMIDT, N. S.; SILVA, C. L. DA. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, p. 467–482, 2018. <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560307>.

SORA, V. M. *et al.* Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1355, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>.

THOMRONGSUWANNAKIJ, T. *et al.* A comparison of virulence genes, antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates from broilers and broiler breeders in Thailand and Australia. **Avian Pathology**, v. 49, n. 5, p. 457–466, 2020. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1764493>.

TÖNNEMANN, V. *et al.* Isolation and Characterization of *Escherichia coli* from Brazilian Broilers. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1463–1463, 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071463>.

TREVISOL, I. M. *et al.* Nova variante do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas nas cadeias produtivas de aves no Brasil. *Instrução Técnica para o Avicultor 41*. Concórdia, SC: **Embrapa Suínos e Aves**, 2022. Versão eletrônica. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1149998/1/final10058.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2024. ISSN 1516-5523.

ZUO, J. *et al.* Lsr operon is associated with AI-2 transfer and pathogenicity in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0725-0>.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos, perfil genotípico de virulência e avaliar o efeito antagonista de cepas de *Lactobacillus* spp. provenientes de produto comercial, frente aos isolados de *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC).

3.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil de virulência de *Escherichia coli* de origem avícola;

Identificar *sequence typing* dos isolados de *E. coli* por PCR;

Caracterizar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos frente aos isolados de APEC;

Avaliar a ação de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de APEC pela técnica de *spot on the lawn*;

Elaborar e registrar como *e-book* uma coletânea de mapas mentais sobre colibacilose aviária para facilitar compreensão, organização e disseminação de informações técnico-científica visualmente atrativa entre os profissionais da avicultura.

RESUMO

A colibacilose aviária, causada por *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC), representa um desafio significativo para a avicultura, impactando a produtividade e resultando em prejuízos econômicos. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos, perfil genotípico de virulência, identificar *sequence typing* e avaliar o efeito antagonista de cepas comerciais de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de APEC. Para isso, foram selecionadas 38 isolados de APEC da bacterioteca do Laboratório de Medicina Aviária (LMA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) isoladas de matrizes de frango de corte com quadro de colibacilose. Para tanto foram realizados os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, determinação de genes de virulência e identificação dos *sequence typing* por *Polimerase chain reaction* (PCR) e avaliado o efeito antagonista do *pool* de *Lactobacillus* spp. comercial contra os isolados de APEC pela técnica *spot on the lawn*. Os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram resistência ao ácido nalídixico 29/38 (76,32%), tetraciclina e enrofloxacina 17/38 (44,74%), bem como, ciprofloxacina 13/38 (34,21%), ampicilina 10/38 (26,32%), sulfam+trimetoprim 3/38 (7,89%), seguido por gentamicina, fosfomicina e cloranfenicol apresentaram 1/38 (2,63%). Menor número de isolados 21,05% (8/38) apresentou perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR) e todas os isolados eram negativas para ESBL. Observou-se que os isolados apresentaram positividade para os genes de virulência *ompT*, *hlyF* e *iss* 97,36% (37/38), 94,73% (36/38) e 84,21% (32/38) respectivamente. Já para os genes de virulência *iutA* e *iroN*, foram observados a presença em 78,94% (30/38) e 81,57% (31/38) dos isolados. No que tange a identificação do perfil de ST, observou-se que 21,05% (8/38) com sendo ST131, 2,63% (1/38) sendo ST23 e 76,32% (29/38) não foi possível determinar. A média dos halos de inibição bacteriana foram de 5,61 mm, e frente a dois isolados (ID: 2953 e 3005) de ST131 foi de 8,5 mm e 8 mm de atividade inibitória. Conclui-se que o uso de probióticos foi capaz de inibir APEC com perfil de resistência a antimicrobianos e MDR, assim como atuar frente a possíveis clones de alto risco (ST131) para a produção avícola.

Palavras-chave: colibacilose, virulência, probiótico, antimicrobiano, antagonismo

ABSTRAT

Avian colibacillosis, caused by Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), represents a significant challenge for poultry farming, impacting productivity and resulting in economic losses. The present study aimed to characterize the phenotypic profile of antimicrobial resistance, genotypic profile of virulence, identify sequence typing and evaluate the antagonistic effect of commercial strains of *Lactobacillus* spp. against APEC isolates. For this, 38 APEC isolates from the bacteriotheque of the Avian Medicine Laboratory (LMA) of the State University of Londrina (UEL) were selected, isolated from broiler breeders with colibacillosis. For this purpose, antimicrobial susceptibility tests, determination of virulence genes and identification of sequence typing by Polymerase chain reaction (PCR) were performed and the antagonistic effect of the commercial *Lactobacillus* spp. pool against APEC isolates was evaluated by the spot on the lawn technique. The results of the antimicrobial susceptibility test showed resistance to nalidixic acid 29/38 (76.32%), tetracycline and enrofloxacin 17/38 (44.74%), as well as ciprofloxacin 13/38 (34.21%), ampicillin 10/38 (26.32%), sulfa+trimethoprim 3/38 (7.89%), followed by gentamicin, fosfomycin and chloramphenicol presented 1/38 (2.63%). A smaller number of isolates 21.05% (8/38) presented multidrug resistance (MDR) profile and all isolates were negative for ESBL. It was observed that the isolates presented positivity for the virulence genes *ompT*, *hlyF* and *iss* 97.36% (37/38), 94.73% (36/38) and 84.21% (32/38) respectively. As for the virulence genes *iutA* and *iroN*, the presence was observed in 78.94% (30/38) and 81.57% (31/38) of the isolates. Regarding the identification of the ST profile, it was observed that 21.05% (8/38) were ST131, 2.63% (1/38) were ST23 and 76.32% (29/38) could not be determined. The mean bacterial inhibition halos were 5.61 mm, and against two isolates (ID: 2953 and 3005) of ST131 were 8.5 mm and 8 mm of inhibitory activity. It is concluded that the use of probiotics was able to inhibit APEC with antimicrobial resistance and MDR profile, as well as act against possible high-risk clones (ST131) for poultry production.

Keywords: colibacillosis, virulence, probiotic, antimicrobial, antagonism.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DE PROBIÓTICOS FRENTE A ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES ISOLADAS DE MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE

4.1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli (*E. coli*) é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Delgado *et al.*, 2019), amplamente disseminado na natureza e os isolados são classificados como não patogênicos ou patogênicos com base na presença de fatores de virulência (Siddi *et al.*, 2025). Nas aves, o patotipo (APEC) é o agente etiológico da colibacilose aviária, uma enfermidade que pode resultar em elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos plantéis (Sora *et al.*, 2021).

Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) destaca-se como um desafio sanitário nas diferentes categorias de produção avícola (Christensen *et al.*, 2021). As infecções causadas por esse microrganismo comprometem a produção de ovos férteis, devido a necessidade de tratamento das aves e podem representar um risco à saúde pública devido do perfil de resistência aos antimicrobianos (Saraiva *et al.*, 2022).

A ampla utilização de antimicrobianos na avicultura contribuiu para a seleção de isolados resistentes de APEC, comprometendo a eficácia dos tratamentos, especialmente frente aos antimicrobianos (Silva, 2018; Nhung *et al.*, 2017), das principais classes empregadas no controle da colibacilose, que incluem: os β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas e aminoglicosídeos (Touchon *et al.*, 2020).

Além do impacto sobre a saúde das aves, APEC tem sido considerada um risco zoonótico, observa-se mundialmente a emergência de linhagens clonais, como ST117 e ST131, o que reforça a necessidade de estratégias de controle (Saidenberg *et al.*, 2024; Roer *et al.*, 2019).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001), reconhecidos em lista “*Generally Recognized as Safe*”

(GRAS) (Buntyn *et al.*, 2016), não patogênicos (Chen *et al.*, 2022), exemplificados por espécies dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., entre outros (Mol *et al.*, 2019).

A suplementação com probióticos tem demonstrado efeitos benéficos na absorção de nutrientes, promovendo a modulação do sistema antioxidante e diminuindo a resposta inflamatória, enquanto seu principal mecanismo de ação envolve a introdução de substratos, resultando na produção de ácidos graxos voláteis que consistem no pH intestinal e criam um ambiente menos propício para a proliferação de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2021; Nam *et al.*, 2022; Al-Fatah, 2020; Swelum *et al.*, 2021).

Cepas de *Lactobacillus* spp. sintetizam bacteriocinas, pequenos peptídeos antimicrobianos geralmente codificados por plasmídeos, que demonstram atividade inibitória contra microrganismos patogênicos (He *et al.*, 2019). Essa propriedade é característica de espécies e linhagens de bactérias lácticas Gram-positiva, intrinsecamente observada em diversos produtos alimentares, contribuindo de forma complementar para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (Chen *et al.*, 2022).

O manejo da colibacilose na produção avícola baseia-se, na adoção rigorosa de práticas de biossegurança, sendo o tratamento realizado, em geral, por meio da antibioticoterapia (Silva, 2018). Entretanto, diante do crescente fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos, torna-se urgente a busca por métodos alternativos que garantam a eficácia do controle (Joseph *et al.*, 2023).

Nesse sentido, estratégias envolvendo o emprego de probióticos têm demonstrado potencial promissor no enfrentamento de APEC (Nawaz *et al.*, 2024). Assim, aliado ao aprimoramento das práticas de biossegurança e à ampliação da disseminação do conhecimento científico, delineia uma abordagem fundamental para mitigar os riscos zoonóticos associados à APEC, protegendo tanto a indústria avícola quanto a saúde pública (Kathayat *et al.*, 2021).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antagonista de *Lactobacillus* spp., oriundo de um produto comercial, contra isolados de APEC identificados de matrizes de frangos de corte.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas 38 isolados bacterianos de APEC, por determinação de dosagens, armazenadas e estocadas na bacterioteca, pertencentes ao Laboratório de Medicina Aviária (LMA) da Universidade Estadual de Londrina, provenientes de matrizes de frangos de corte com suspeita de colibacilose.

5.2 Sensibilidade aos antimicrobianos

A sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi determinada por meio do método de disco-difusão, conforme as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020).

Os antimicrobianos testados em meio *Mueller-Hinton* (MH) foram: ertapenem (ETP – 10 µg), enrofloxacin (EN - 5 µg), ceftiofur (CTF - 30 µg), ciprofloxacina (CIP - 5 µg), cefoxitina (CFE – 30 µg), ampicilina (AMP - 10 µg), gentamicina (GEN - 10 µg), cloranfenicol (CLO - 30 µg), ácido nalidíxico (NAL - 30 µg), cefepime (CPM - 30 µg), cefoxitina (CFO - 30 µg), sulfametoxazol + trimetoprim (SUT - 1,25/23,75 µg), tetraciclina (TET - 30 µg) ceftazidima (CAZ - 30 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), aztreonam (ATM - 30 µg), cefotaxima (CTX - 30 µg) e fosfomicina (FOS - 200 µg). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

5.3 Produção de β -lactamase de espectro estendido

Para a detecção a produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), foi utilizado o teste de sinergia em disco duplo, com a utilização de 4 antimicrobianos, sendo: amoxicilina + ácido clavulânico (AMX/C - 20/10 µg), ceftazidima (CAZ - 30 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), aztreonam (ATM - 30 µg) e cefotaxima (CTX - 30 µg) conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020)

Para isso o disco de AMX/C foi colocado no centro da placa contendo ágar *Mueller-Hinton* (MH), com os demais discos ceftazidima (CAZ - 30 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), aztreonam (ATM - 30 µg) e cefotaxima (CTX - 30 µg) posicionados a uma distância de 20 mm da borda do disco central. Qualquer distorção ou aumento

da área de inibição ao redor do disco de AMX/C foi considerado indicativo de produção de ESBL (CLSI, 2020).

5.4 Extração de DNA e detecção dos genes de virulência

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, posteriormente, submetidas à extração de DNA. A extração foi realizada por meio da técnica utilizada por Kanabata *et al.* (2019).

A detecção dos genes de virulência *iutA*, *hlyF*, *iss*, *ironN* e *ompT* foi conduzida nos isolados seguindo o protocolo descrito por Johnson *et al.* (2008), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação dos genes de virulência de isolados de *E. coli*.

Genes de virulência	Sequência dos <i>primers</i>	Gene alvo	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
<i>hlyF</i>	5'-GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC-3' 3'-GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG-5'	Hemolisina aviária <i>hlyF</i> (plasmídeo APEC)	450
<i>ompT</i>	5'-TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT-3' 3'-TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC-5'	Protease de membrana externa (plasmídeo APEC)	496
<i>iroN</i>	5'-AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT-3' 3'-GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT-5'	Gene do receptor de sideróforo de Salmochelina	553
<i>iss</i>	5'-CAGCAACCCGAACCACTTGATG-3' 3'-AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA-5'	Gene epissômico de sobrevivência sérica aumentada	323
<i>iutA</i>	5'-GGCTGGACATCATGGGAACTGG-3' 3'-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-5'	Gene do receptor sideróforo de aerobactina	302

5.5 Identificação de *Sequence Typing*

O DNA extraído dos isolados foram submetidos a um segundo PCR baseada nos protocolos de Johnson *et al.* (2022). Os isolados foram considerados positivas para o gene de interesse quando apresentaram um *amplicon* com o tamanho conforme apresentado na Tabela 2.

1 **Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores para identificar *sequence typing* ST23, ST131, ST355_1, ST355_2, ST117, ST428 e O78 de isolados de *E. coli*.

Sequence typing	Sequência dos primers	Gene alvo	Tamanho do amplicon (pb)
ST23	5'-TGGAGCTAAATGACCCGAC-3' 3'-AACCAGACGTGCCACATTG-5'	Proteína da família da holina do fago (ST23)	263
ST355_1	5'-TCAGAGAAGATTGAAGAGGGCG-3' 3'-AATACTCCACCTGAGAGTCCCG-5'	Proteína hipotética (ST355)	305
ST117	5'-GATGCCATAAGGAAGAACGAG-3' 3'-CGAGCCATTGGATTGCAAC-5'	Adesina fimbrial da família StfH/YfcO (ST117)	360
ST428	5'-GTGTGCTATGCACTACAGG-3' 3'-CTTCAGCAGGTTTCAGTCATTC-5'	Subunidade β RNA polimerase direcionada ao DNA (ST428)	400
ST355_2	5'-TGCTTGAGAATGTGAAGAACC-3' 3'-AGGTGTCAGTCTTCTTGGTC-5'	DNA citosina metiltransferase (ST355)	548
ST131	5'-GTTCGACAAAATCCTCTCCG-3' 3'-GCACAACCAGACAAAGCAG-5'	Transportador de cátions metálicos divalentes (ST131)	578
O78	5'-CGATGTTGAGCGCAAGGTTG-3' 3'-TAGGTATTCCTGTTGCGGAG-5'	Gnd-Wzx (grupo de genes O78 <i>rfb</i>)	623

5.6 *Spot on the lawn*

Foi utilizado produto comercial destinados ao uso na avicultura contendo 11 cepas probióticas sendo: três cepas de *Lactobacillus bugarius*, duas cepas de *Lactobacillus casei*, duas cepas de *Lactobacillus cellobiosus*, três cepas de *Lactobacillus fermentum* e uma cepa de *Lactobacillus helveticus*, com intuito de avaliar o efeito antagonista frente aos isolados de APEC.

Para o ensaio de antagonismo, foi avaliada a ação de um produto comercial contendo 11 cepas de *Lactobacillus* spp. utilizando a técnica de *Spot on the Lawn* (Ribeiro *et al.*, 2024). Inicialmente, foi realizada a incubação de 0,06 g do produto comercial em caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), a 37°C por 24 horas em condições de microaerofilia. Após 24 horas, uma alíquota de 20 µL da cepa probiótica foi semeada em placa de ágar MRS e incubadas nas condições anteriores.

Paralelamente, os isolados de APEC foram incubadas em caldo BHI a 37°C por 24 horas em condições de aerobiose. Após 24 horas, 100 µL do inoculado de APEC em caldo BHI (10^7 UFC/mL) foram transferidos para 10 µL de BHI semissólido e posteriormente o material foi depositado sobre o ágar MRS previamente inoculado com *Lactobacillus* spp., sendo as placas incubadas a 37°C por 24 horas.

A quantificação bacteriana foi realizada por meio de contagem decimal seriada na manipulação de cada microrganismo. Assim, uma alíquota de 100 µL de cada concentração bacteriana foi homogeneizada separadamente em 900 µL de PBS (10^{-1}), esse processo foi realizado até atingir 10^7 UFC/mL de diluição.

Após o período de 24 horas, foi possível observar a formação dos halos de inibição os quais foram mensurados com um paquímetro, sendo considerado como atividade inibitória positiva diâmetro de >1mm (Costa *et al.*, 2018).

6 RESULTADOS

Em nosso estudo, no que tange aos genes de virulência (Tabela 3), observou-se que os isolados tiveram a presença dos genes *ompT*, *hlyF* e *iss* de 97,36% (37/38), 94,73% (36/38) e 84,21% (32/38) respectivamente. Já para os genes *iutA* e *iroN*, foram observados a presença em 78,94% (30/38) e 81,57% (31/38) dos isolados.

Foi observado na determinação de ST por PCR, 21,05% (8/38) com perfil ST131 (ID: 2953, ID: 3005, ID: 3006, ID: 3008, ID: 3010, ID: 3058, ID: 3059, ID: 3289), 2,63% (1/38) ST23 (ID: 3306) e 76,32% não foi detectado ST (Tabela 3). Para o sorogrupo O78, 2,63% (1/38), detectado apenas um isolado ID: 3302 (Tabela 3)

As amostras ST131 foram positivas a 100% dos genes de virulência pesquisados. Já o isolado de *E. coli* O78 foi positiva para os genes *iutA*, *iss*, *ompT*, *hlyF*, enquanto o isolado ST23 foi negativa aos genes.

Tabela 3. Perfil do *sequence typing* e genes de virulência (*iroN*, *iutA*, *iss*, *ompT*, *hlyF*) dos isolados de APEC de quadros de colibacilose em matrizes de frango de corte.

Identificação dos isolados n=38	Origem (lesão)	Sequence typing - ST	Genes de virulência
2947	Pericardite	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2948	Salpingite	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2949	Salpingite	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2950	Septicemia	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2951	Salpingite	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2952	Septicemia	n.i	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
2953	Salpingite	ST131	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>
3005	Fibrina (cavidade celomática)	ST131	<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i>

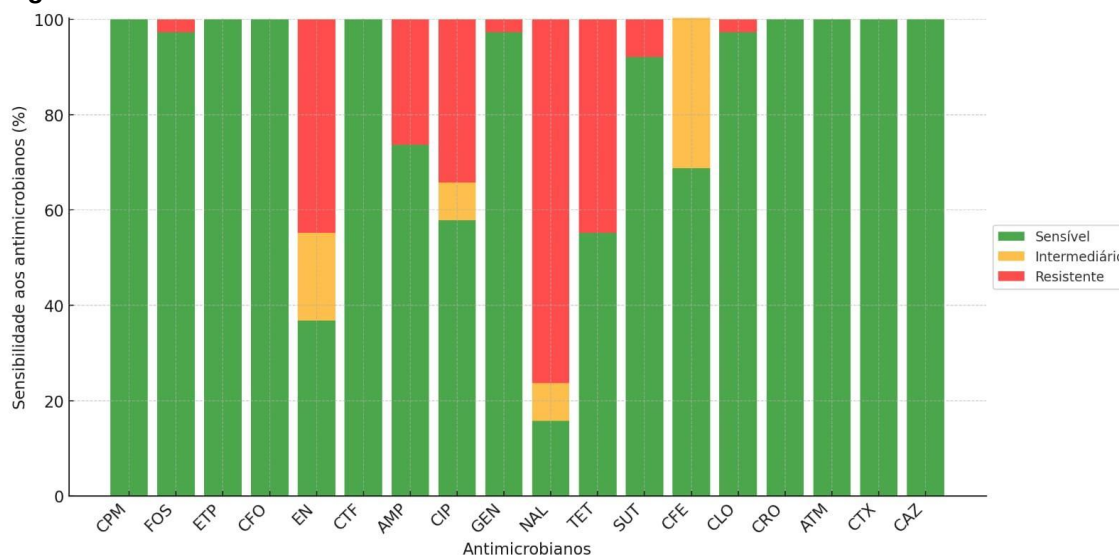
3006	Ascite	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3007	Salpingite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3008	Ascite	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3009	Salpingite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3010	Septicemia	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3058	Ascite	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3059	Salpingite	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3060	Septicemia	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT</i>
3284	Salpingite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3285	Ascite	n.i	<i>ompT, hlyF</i>
3286	Salpingite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3287	Salpingite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3288	Ascite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3289	Septicemia	ST131	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3290	Salpingite	n.i	<i>iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3291	Ascite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3292	Salpingite	n.i	<i>iroN, iss, ompT, hlyF</i>
3293	Septicemia	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3300	Salpingite	n.i	<i>ompT, hlyF</i>
3301	Celulite	n.i	<i>iroN, ompT, hlyF</i>
3302	Septicemia	O78	<i>iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3303	Septicemia	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>

3304	Salpingite	n.i	<i>ompT, hlyF</i>
3305	Ascite	n.i	<i>iroN, iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3306	Septicemia	ST23	n.i
3307	Septicemia	n.i	<i>iroN, ompT, hlyF</i>
3362	Septicemia	n.i	<i>iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3363	Septicemia	n.i	<i>iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3364	Septicemia	n.i	<i>iutA, iss, ompT, hlyF</i>
3365	Septicemia	n.i	<i>iroN, iss, ompT, hlyF</i>

n.i: não informado

Foi verificada resistência aos antimicrobianos dos isolados bacterianos contra ácido nalidíxico 29/38 (76,32%), tetraciclina e enrofloxacina 17/38 (44,74%), bem como, ciprofloxacina 13/38 (34,21%), ampicilina 10/38 (26,32%), sulfam+trimetoprim 3/38 (7,89%), seguido por gentamicina, fosfomicina e cloranfenicol que apresentaram 1/38 (2,63%), representados na Figura 1.

Figura 1. Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos dos isolados de APEC $n=38$.



Ertapenem (ETP – 10 µg) aztreonam (ATM - 30 µg), cefotaxima (CTX - 30 µg), ceftazidima (CAZ - 30 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), enrofloxacina (EN - 5 µg), ceftiofur (CTF - 30 µg), ciprofloxacina (CIP - 5 µg), cefoxitina (CFE – 30 µg), ampicilina (AMP - 10 µg), gentamicina (GEN - 10 µg), cloranfenicol (CLO - 30 µg), ácido nalidíxico (NAL - 30 µg), cefepime (CPM - 30 µg), cefoxitina (CFO - 30 µg), sulfametoxazol + trimetoprim (SUT - 1,25/23,75 µg), tetraciclina (TET - 30 µg) e fosfomicina (FOS - 200 µg).

Observou-se que os isolados de APEC com perfil intermediárias sendo cefoxitina 12/38 (31,58%), enrofloxacina 7/38 (18,42%), seguido por ácido nalídixico e ciprofloxacina ambos 3/38 (7,89%), de acordo com a Figura 1.

Em nosso estudo, todos os isolados de APEC recuperadas quadro de colibacilose em matrizes de frango de corte, foram negativas para produção de ESBL. Quanto ao perfil de resistência múltipla a drogas (MDR), observou-se 21,05% (8/38) dos isolados, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Produção de ESBL, resistência múltipla a droga (MDR) e classes de antimicrobianos dos isolados de APEC (n=38) de quadros de colibacilose em matrizes de frango de corte.

Identificação dos isolados	Origem (lesão)	Produção de ESBL	Resistência múltipla a droga (MDR)
3007	Salpingite	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL) e tetraciclina (TET)
3009	Salpingite	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL) e tetraciclina (TET)
3292	Salpingite	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL, EN, CIP), fosfomicina (FOS) e tetraciclina (TET)
3302	Septicemia	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL) e tetraciclina (TET)
3305	Ascite	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL), alfenicol (CLO) e tetraciclina (TET)
3363	Septicemia	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL, EN, CIP), sulfonamida (SUT) e aminoglicosídeo (GEN)
3364	Septicemia	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL, EN, CIP) e sulfonamida (SUT)
3365	Septicemia	Negativo	β -lactâmicos (AMP), quinolona (NAL, EN, CIP), sulfonamida (SUT) e tetraciclina (TET)

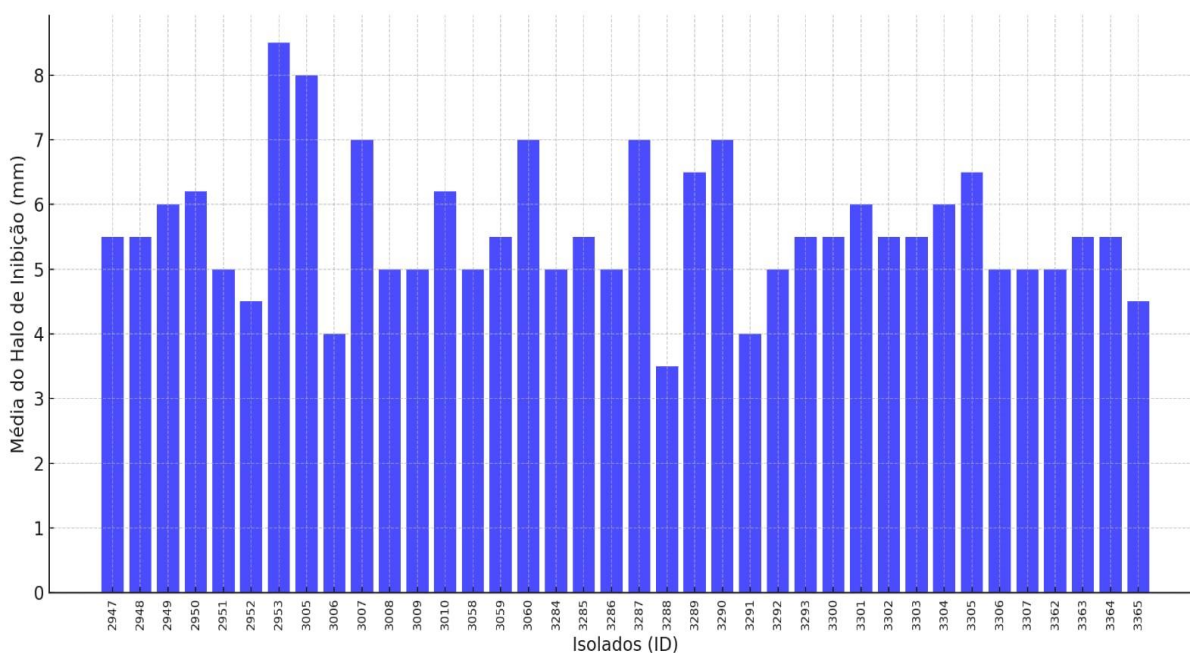
NAL – ácido nalídixico, AMP – ampicilina, CIP – ciprofloxacina, EN – enrofloxacina, ESBL – Produção de β -lactamase de espectro estendido, FOS – fosfomicina, GEN – gentamicina, SUT – sulfametoxazol + trimetoprim e TET – tetraciclina.

Em relação ao teste do efeito antagonistas de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados da APEC, por meio da técnica *spot on the lawn*, revelou variações no diâmetro dos halos de inibição, com uma média geral de 5,61 mm, representados na Figura 2.

Observou-se que os maiores halos de inibição foram de 8,5 mm (1/38) e 8 mm (1/38), representando 2,63% dos isolados cada. Em seguida, foram observados halos de 7 mm em 18,72% (4/38) dos isolados, 6,5 mm em 5,26% (2/38), 6,2 mm em 5,26% (2/38) e 6 mm em 7,89% (3/38).

A maioria dos isolados apresentou halos de 5 mm, correspondendo a 26,31% (10/38), seguida por 5,5 mm em 23,68% (9/38). Diâmetros de 4,5 mm e 4 mm foram observados em 5,26% dos isolados cada (2/38), enquanto halos de 3,5 mm foram registrados em 2,63% (1/38).

Figura 2. Diâmetro dos halos (mm) de inibição do *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de APEC provenientes de lesões de colibacilose em matrizes de frango de corte.



7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo os isolados de APEC, em matrizes de frangos de corte com quadros clínicos de colibacilose, apresentaram predominantemente os genes *ompT*, *hlyF* e *iss* corroborando com estudo realizado por Thomrongsuwannakij *et al.* (2020) avaliaram amostras de APEC ($n=200$) isoladas de matrizes de frangos de corte na Tailândia e Austrália. Johnson *et al.* (2008) associaram os genes específicos de virulência (*specific virulence genes* - VAGs) e APEC, sendo eles *iss* (gene de aumento da sobrevivência do soro), *ompT* (gene da proteinase da membrana externa), *hlyF* (gene da hemolisina F), *iroN* (gene do receptor do sideróforo da salmochelina) e *iutA* (gene do receptor da aerobactina).

Johnson *et al.* (2022) revisaram e redefiniram o patotipo APEC, por meio da inclusão de grupos clonais de alto risco, propondo o uso de dois marcadores do plasmídeo de APEC (*hlyF* e *ompT*), associado a ST específicas (ST23, ST117+O78, ST131, ST355, ST428) ou sorogrupo (O78) como uma ferramenta para a identificação de APEC de alto risco, que geralmente são as responsáveis por quadros graves na produção avícola. Em nosso estudo, ao aplicarmos essa definição, detectamos a presença de ST23 e ST131 nos isolados avaliados, indicando a importância do diagnóstico e identificação para o controle das infecções por esses grupos clonais.

Foi observado em nosso de estudo que os dois maiores halos de inibição (aproximadamente 8mm) obtidos foram frente a isolados de ST131 (ID2953 e ID 3005) apesar de nenhuma delas ter perfil MDR, as duas apresentaram resistência a antimicrobianos como tetraciclina e ciprofloxacina, respectivamente.

De acordo com estudo realizado por Tan *et al.* (2023) investigando a prevalência e o perfil de resistência antimicrobiana de patógenos bacterianos isolados na China, entre 2020 e 2022, as cepas de APEC ($n=126$) exibiram taxas elevadas de resistência a vários antimicrobianos, com resistência à amoxicilina e ampicilina alcançando 89,68% (113/126) e resistência a florfenicol de 83,33% (105/126). Em nosso estudo, o percentual de resistência à ampicilina foi inferior 23,31% (10/38) sugerimos que essa diferença possa estar associada à amostragem, bem como, sistema de produção fragmentado do país, que foi superior ($n=126$) a empregada em nosso estudo ($n=38$).

A avicultura chinesa enfrenta desafios com o uso terapêutico de antimicrobianos e surtos frequentes de Influenza Aviária, enquanto o controle sanitário e a rastreabilidade avançam gradualmente, mas ainda encontram limitações entre pequenos e médios produtores, comprometendo a eficiência produtiva e a segurança alimentar (Tan *et al.* 2023).

A definição de MDR é apresentada quando um isolado bacteriano é resistente a pelo menos três classes de antimicrobianos (Sweeney *et al.* 2018). Neste estudo foi observada uma taxa inferior ao observado por Gazal *et al.*, (2021) que encontraram 90% de isolados de APEC com perfil MDR granjas avícolas do estado do Paraná.

Em Portugal no período de 2009 a 2018, Oliveira *et al.* (2022) ao investigarem isolados de APEC ($n=264$) de lesões de colibacilose de matrizes de frango de corte, encontraram resistência 63,3% (167/264) a tetraciclina e correlacionam essa taxa ao uso frequente do medicamento para tratamento de lotes de matrizes. Os dados corroboram com os valores observados em nosso estudo que foi de aproximadamente 44,73% (17/38), e sustentamos a mesma teoria do amplo uso do medicamento na produção avícola.

No que tange a produção de ESBL, não foram detectados isolados com esse perfil, diferindo de Menck-Costa *et al.* (2022) que encontraram 51% (260/507) de isolados de *E. coli* com capacidade produção de ESBL. Essa diferença possa ser atribuída ao número e perfil das amostras, já que os autores trabalharam com monitoria, recuperando *E. coli* de diferentes fontes (cascudinho, ceco e cama) e não exclusivamente em isolados de APEC de origem de lesões conforme realizado em nosso estudo.

A fosfomicina é um antimicrobiano considerado de eleição para o tratamento de infecções por *E. coli* multirresistente em humanos com infecções do sistema urinário, devido ao seu mecanismo de ação único, sem resistência cruzada com outros antimicrobianos (Hidalgo *et al.*, 2024), dessa forma esse perfil de resistência sempre provoca alerta e preocupação. Em nosso estudo foi detectado 2,63% (1/38) de resistência à fosfomicina, contrastando com os estudos de Menck-Costa *et al.* (2022) que detectaram 68% (344/507) dos isolados de *E. coli* positivos para o gene *fosA3*, sendo amostras de swab cloacal, mecônio, cascudinho e cama de frango.

O perfil de resistência a antimicrobianos detectados em nosso estudo e em estudos prévios (Saraiva *et al.*, 2022; Nhung *et al.*, 2017; Touchon *et al.*, 2020) revelaram a necessidade de buscar por estratégias seguras e a redução no uso de antimicrobianos, diante disso a utilização de probióticos é uma alternativa, devido a produção de bacteriocinas consideradas como uma estratégia (Lagha *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, observamos um expressivo efeito antagonista das cepas de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de APEC, com halos de inibição médio de 5,61 mm contrastando com os resultados obtidos por Reuben *et al.* (2019) que observaram uma média de 2,2 mm de halos de inibição de seis cepas probióticas (*Lactobacillus reuteri* I2, *Pediococcus acidilactici* I5, *P. acidilactici* I8, *P. acidilactici* c3, *P. pentosaceus* I13 e *Enterococcus faecium* c14) contra uma *E. coli* O157:H7. Esta divergência de resultado pode estar associada tanto às características do probiótico, quanto ao perfil da cepa de *E. coli* que foram testadas, já que ambas são distintas nos dois estudos.

A variação da formação de um halo para outro apresentado pelas cepas de *Lactobacillus* spp. são fortemente defendida através da produção em maior ou menor quantidade de substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas, cujas caracterizações específicas definem tais ocorrências (Lagha *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, não foi caracterizado o metabólito responsável pela inibição de APEC, diferindo da abordagem de Poppi *et al.* (2015), que identificaram a produção de ácidos orgânicos como um dos mecanismos inibitórios ao avaliar o efeito antagônico de oito cepas de *Lactobacillus* spp. contra *E. coli* O157:H7 pela técnica *spot on the lawn*, utilizando meio MRS convencional e MRS tamponado com bicarbonato de sódio (35 mM), os autores observaram uma redução nos halos de inibição de 15,62 mm para 14,33 mm, indicando que a acidificação do meio desempenhou um papel fundamental no efeito inibitório, mas que outros metabólitos antimicrobianos, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, também contribuíram para a inibição do patógeno.

Foi observado em nosso estudo que os maiores halos de inibição foram de 8,0 mm e 8,5 mm (ID: 3005 e ID: 2953), contrastando com os resultados de Li *et al.* (2024), que relataram uma zona de inibição de 21,33 mm ao utilizar *L. reuteri* entre dez cepas probióticas contra uma amostra *E. coli* ATCC 25922, e

acreditamos que o diâmetro de inibição expressiva observada nesse estudo esteja relacionada à utilização de uma cepa comercial de *E. coli*, diferindo do nosso estudo que utilizamos $n=38$ isolados de APEC.

Melara *et al.* (2023) demonstraram que o efeito antagônico de *Lactobacillus reuteri* frente a uma amostra de *E. coli* ATCC 11775 resultou em um halo de inibição de 12,50 mm, divergindo do nosso estudo, que avaliou $n=38$ isolados de APEC com um produto comercial contendo 11 cepas de *Lactobacillus* spp., onde o menor halo de inibição registrado foi de 3,5 mm (ID: 3288), o que pode indicar menor eficácia do produto em determinadas condições ou refletir a variabilidade na resistência dos isolados bacterianos, sugerindo que a ação antimicrobiana do probiótico depende da composição da microbiota alvo e da sinergia entre as cepas probióticas.

A implementação de estratégias de controle da colibacilose aviária que associem medidas de biossegurança e a redução do uso de antimicrobianos é essencial para mitigar a seleção de microrganismos resistentes. Neste contexto, os resultados deste estudo indicam que os probióticos podem contribuir e ser uma alternativa de controle e manejo da doença nos plantéis avícolas.

8 CONCLUSÃO

Revelou-se, ante o exposto, que o produto comercial contendo 11 cepas de *Lactobacillus* spp. exerceu efeito antagonista contra isolados de APEC provenientes de lesões de colibacilose em matrizes de frango de corte, reforçando o potencial do probiótico no manejo de bactérias patogênicas sendo uma alternativa promissora em surtos da doença a campo.

9 REFERÊNCIAS

ABPA - **Associação Brasileira de proteína animal. Relatório Anual 2024.** Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf. Acesso em: 23 jan. 2025.

AL-FATAH, A. *et al.* Probiotic modes of action and its effect on biochemical parameters and growth performance in poultry. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 10, n. 1, p. 9-15, 2020. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20203142509>.

BUNTYN, J. O. *et al.* The Role of Direct-Fed Microbials in Conventional Livestock Production. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 335–355, 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111123>.

CARVALHO, J., L. C.; GIAROLA, P. C. M. Um retrato da cadeia produtiva de carne avícola em Santa Catarina e no Brasil no início do século XXI. **Revista Americana de Empreendedorismo e Inovação**, v. 2, n. 2, p. 141-150, 2020. <https://doi.org/10.33871/26747170.2020.2.2.3350>.

CHEN, P. *et al.* Effects of Probiotics and Gut Microbiota on Bone Metabolism in Chickens: A Review. **Metabolites**, v. 12, n. 10, p. 1000–1000, 2022. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>.

CHRISTENSEN, H.; BACHMEIER, J.; BISGAARD, M. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Avian Pathology**, p. 1–12, 2021. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1845300>.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. Wayne, PA: CLSI; 2020.

COSTA, W. K. A. *et al.* Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. **Food Research International**, v. 108, p. 172–182, 2018.

DELGADO, L. A. *et al.* Atividade Antibacteriana do Extrato Etanólico Bruto da *Gossypium hirsutum* L. contra Cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 3, p. e227-e227, 2019. <https://doi.org/10.25248/reas.e227.2019>.

GAZAL, L. E. DE S. *et al.* Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomycin-Resistant *Escherichia coli* From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604544>.

HE, T. *et al.* Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. **Animals**, v. 9, n. 11, p. 985, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9110985>.

HIDALGO, E. *et al.* Maintained susceptibility to fosfomycin in extra-hospitalary urinary isolates of *Escherichia coli*. Strong association of fosfomycin resistance with age and ESBL production. *Revista Española de Quimioterapia*, 2024. <https://doi.org/10.37201/req/016.2024>

JOHNSON, Timothy J. *et al.* Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008. <https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>.

JOHNSON, T. J. *et al.* Refining the definition of the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype through inclusion of high-risk clonal groups. **Poultry science**, v. 101, n. 10, p. 102009, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102009>.

JOSEPH, J. *et al.* Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broiler Breeders with Colibacillosis in Mississippi. **Poultry**, v. 2, n. 1, p. 24–39, 2023. <https://doi.org/10.3390/poultry2010004>.

KANABATA, B. *et al.* Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Strains of *Escherichia Coli* Isolated from Avian Cellulitis Lesions. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 21, n. 3, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2019-0981>.

LAGHA, A. B. *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>

LANDMAN, W. J. M.; VAN ECK, J. H. H. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. **Avian Pathology**, v. 44, n. 5, p. 370–378, 2015. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1060584>.

LI, X. *et al.* Characterization and assessment of native lactic acid bacteria from broiler Intestines for potential probiotic properties. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 749–749, 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040749>.

MEHDI, Y. *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 170–178, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.

MELARA, E. G. *et al.* Characterization of autochthonous strains from the cecal content of creole roosters for a potential use as probiotics. **Animals**, v. 13, n. 3, p. 455, 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13030455>.

MENCK-COSTA *et al.* High-Frequency detection of *fosA3* and *blaCTX-M-55* genes in *Escherichia coli* from longitudinal monitoring in broiler chicken farms. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846116>.

MOL, N. *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* infection of a chicken lung epithelial cell line. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 210, p. 55–59, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.03.007>.

NAM, T. V. B. *et al.* Effects of probiotic (*Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*) supplementation on mortality, growth performance, and carcass characteristics of native Vietnamese broilers challenged with *Salmonella* Typhimurium. **Veterinary World**, p. 2302–2308, 2022. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2302-2308>.

NAWAZ, S. *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): current insights and future challenges. **Poultry Science**, v. 103, n. 12, p. 104359, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104359>.

NHUNG, N. T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; CARRIQUE-MAS, J. J. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, 2017. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>.

NOLAN L. K *et al.* Doenças de aves. 13^a ed. John Wiley & Sons Inc.; Hoboken, NJ, EUA: 2019. pp. 770–830.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Phenotypic antimicrobial resistance (AMR) of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler breeder flocks between 2009 and 2018. **Avian Pathology**, p. 1–23, 2022. <https://doi.org/10.1080/03079457.2022.2074816>.

PENG, Lu-Yuan *et al.* Baicalin alleviated APEC-induced acute lung injury in chicken by inhibiting NF-κB pathway activation. **International Immunopharmacology**, v. 72, p. 467-472, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.046>.

POPPI, L. B. *et al.* Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 353–359, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000400007>.

REUBEN, R. C. *et al.* Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>.

RIBEIRO, G. C. *et al.* Standardization of the *Spot on the Lawn* antagonism test in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg by *Lactobacillus salivarius*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 76, n. 2, p. 367–373, 2024. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-13059>.

ROER, L. *et al.* ST131 *fimH*22 *Escherichia coli* isolate with a *bla*CMY-2/*IncI1*/ST12 plasmid obtained from a patient with bloodstream infection: highly similar to *E. coli* isolates of broiler origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 557–560, 2019. <https://doi.org/10.1093/jac/dky484>.

SAIDENBERG, A. B. S. *et al.* *Escherichia coli* ST117: exploring the zoonotic hypothesis. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 10, 5 set. 2024. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00466-24>.

SANTOS, A. S. *et al.* Phylogenetic analysis, biofilm production, and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from slaughtered pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1309–1315, 2018. <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/3HnJxPYxvkxfLMpWgLjkPct/?lang=en&format=pdf>.

SARAIVA, M. *et al.* Antimicrobial resistance in the globalized food chain: A One Health perspective applied to the poultry industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-22, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00635-8>.

SIDDI G. *et al.* Characterization and antimicrobial resistance of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from pigs in Sardinia (Italy). **International Journal of Food Microbiology**, p. 111156–111156, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111156>

SILVA, R. M. *et al.* Colimetric index and virulence genes *iss* and *iutA* in *Escherichia coli* isolates in cellulitis of poultry carcasses under sanitary inspection. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 19, n. 4, p. 371–380, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402018000400002>.

SILVEIRA, L. A. S; ARAÚJO, M. M. Mapas mentais na aprendizagem: um guia para professores. 1. ed. Vitória: Diálogo Comunicação e Marketing, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ivc.br/bitstream/handle/123456789/1742/Ebook%20Liza%20PUBLICADO.pdf?sequence=1>. Acesso em: Set/2024

SCHIMIDT, D. B. *et al.* Pressão seletiva antimicrobiana e a expressão da resistência a oxacilina em *staphylococcusa aureus*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 102869, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102869>.

SWELUM, A. A. *et al.* Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview. **Poultry Science**, v. 100, n. 5, p. 101039, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101039>.

SWEENEY, M. T. *et al.* Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1460–1463, 2018. <https://doi.org/10.1093/jac/dky043>.

TAN, M.-F. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance profile of bacterial pathogens isolated from poultry in Jiangxi Province, China from 2020 to 2022. **Poultry Science**, v. 102, n. 8, p. 102830, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102830>.

THOMRONGSUWANNAKIJ, T. *et al.* A comparison of virulence genes, antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates from broilers and broiler breeders in Thailand and Australia. **Avian Pathology**, v. 49, n. 5, p. 457–466, 2020. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1764493>.

TOUCHON, M. *et al.* Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. **PLOS Genetics**, v. 16, n. 6, p. e1008866, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008866>.

VARGA, C. *et al.* Evaluating Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Broiler and Broiler Breeder Chickens in Ontario, Canada. **Avian Diseases**, v. 62, n. 3, p. 291–299, 2018. <https://doi.org/10.1637/11834-032818-Reg.1>.

WANG, J.-K.; YAO, S. K. Roles of Gut Microbiota and Metabolites in Pathogenesis of Functional Constipation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1–12, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5560310>.

ZAMOJSKA, D. *et al.* Probiotics and Postbiotics as Substitutes of Antibiotics in Farm Animals: A Review. **Animals:an Open Access Journal from MDPI**, v. 11, n. 12, p. 3431, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11123431>.

10 PRODUÇÃO TECNOLÓGICA

COLETÂNEA DE MAPAS MENTAIS - Colibacilose aviária

A elaboração do *e-book* de mapas mentais sobre APEC teve como objetivo organizar informações sobre colibacilose aviária a fim de facilitar a compreensão, e promover a disseminação técnico-científica entre profissionais da avicultura auxiliando na tomada de decisão no campo.

A coletânea de mapas mentais sobre APEC foi desenvolvida na plataforma *Canva*, empregando uma abordagem visual para otimizar a assimilação e a aplicação do conhecimento.

O desenvolvimento do material seguiu uma abordagem estruturada em etapas, abrangendo a organização dos conteúdos, a seleção de *templates* adequados, a elaboração dos mapas mentais com recursos gráficos para enfatizar as conexões entre os conceitos e a revisão técnica (Silveira et al., 2023).

Essa metodologia resultou em um recurso acessível e funcional, contribuindo para a tomada de decisão de médicos veterinários e técnicos atuantes na avicultura. O produto está apresentado abaixo na forma de imagens a fim de facilitar a inclusão neste documento.

COLETÂNEA DE MAPAS MENTAIS

Colibacilose Aviária

● Gabriela Alexandre Stevanato

● Profª e Drª Ana Angelita S. Baptista



Escherichia coli patogênica aviária- APEC

Bactéria, GRAM-Negativa



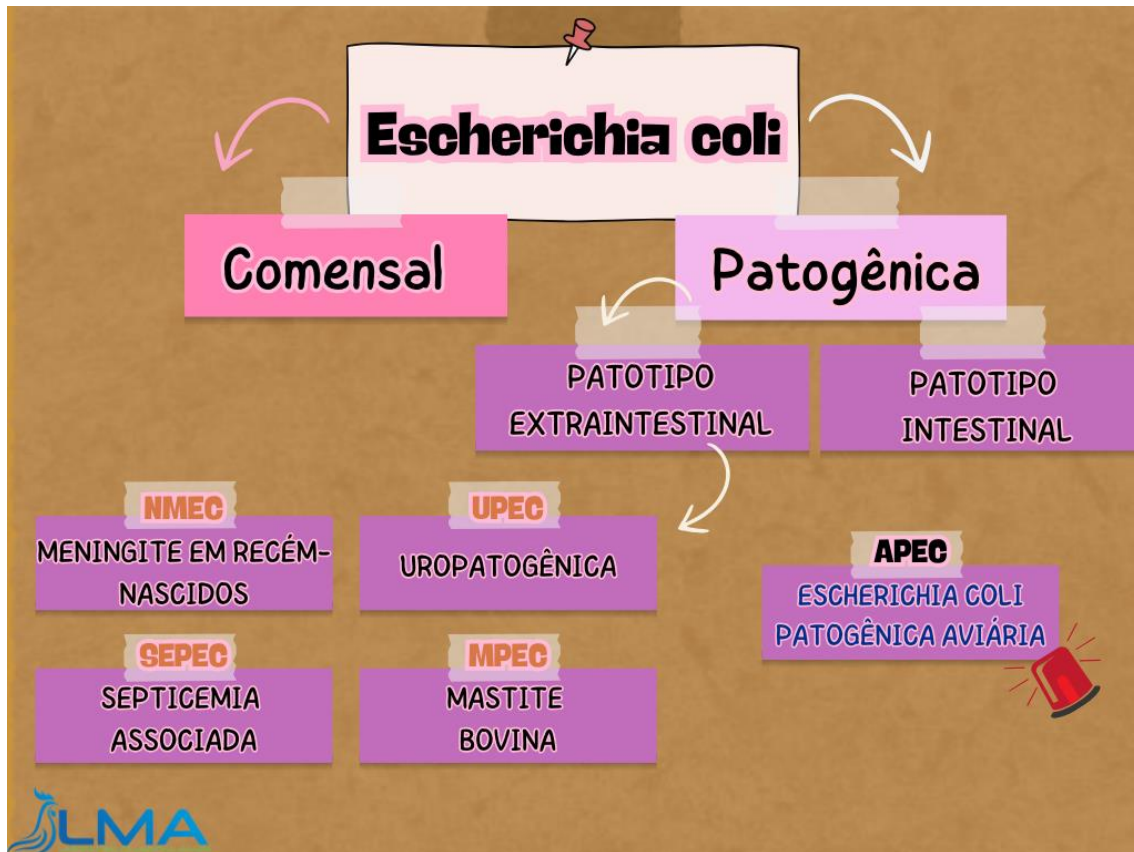
Sorotipos mais frequentes: 01, 02 e 078

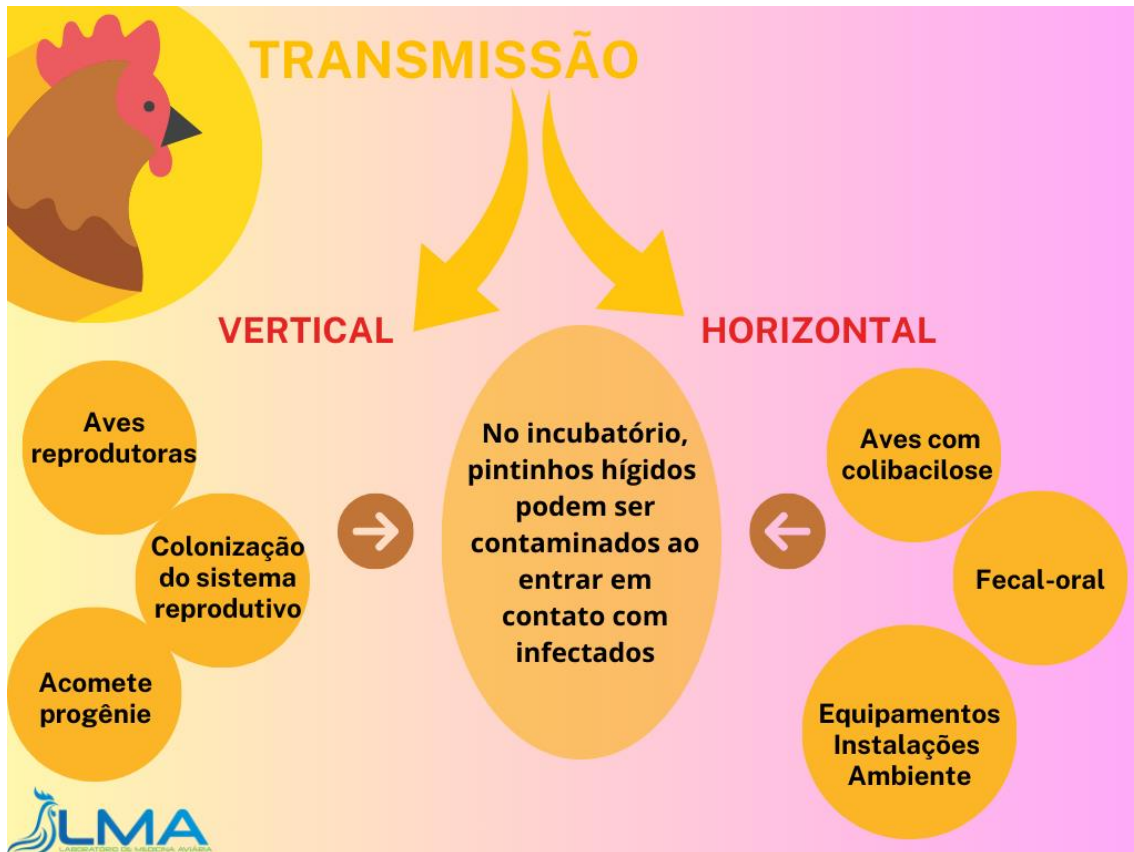
INFECÇÕES: respiratórias, sistêmicas e reprodutivas

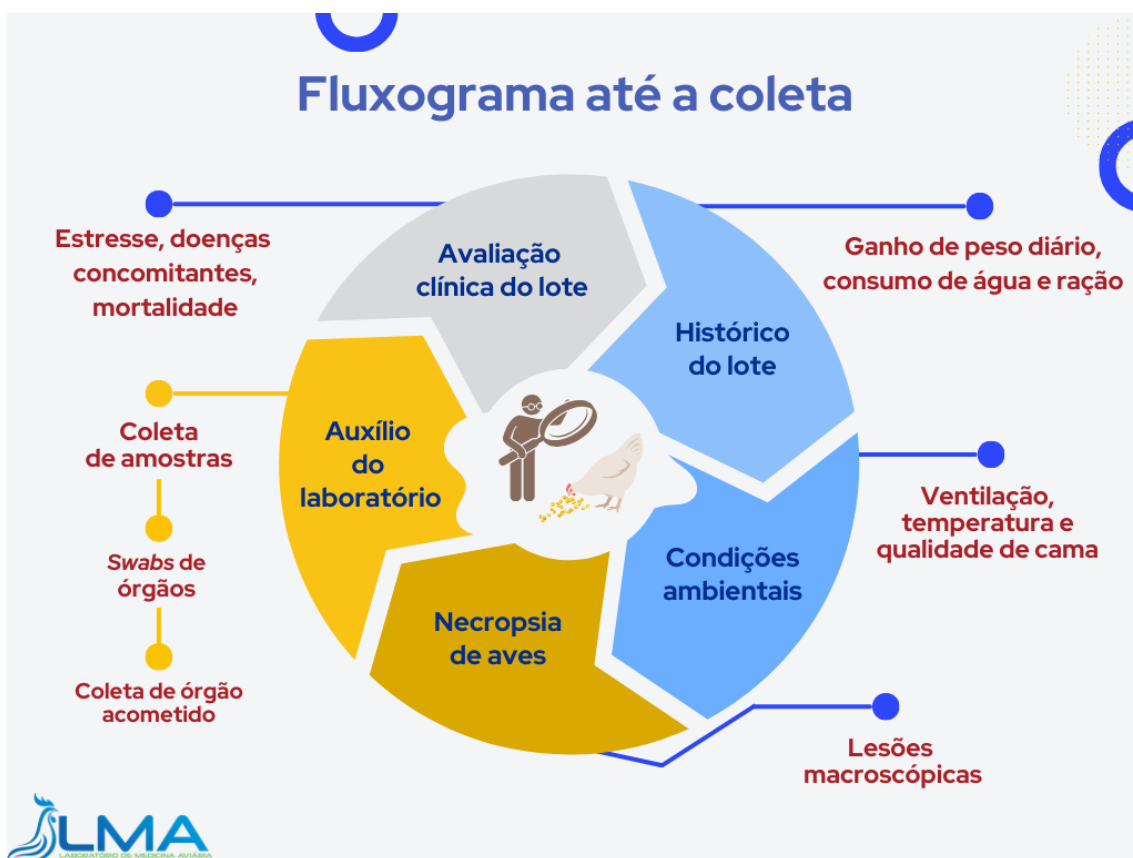
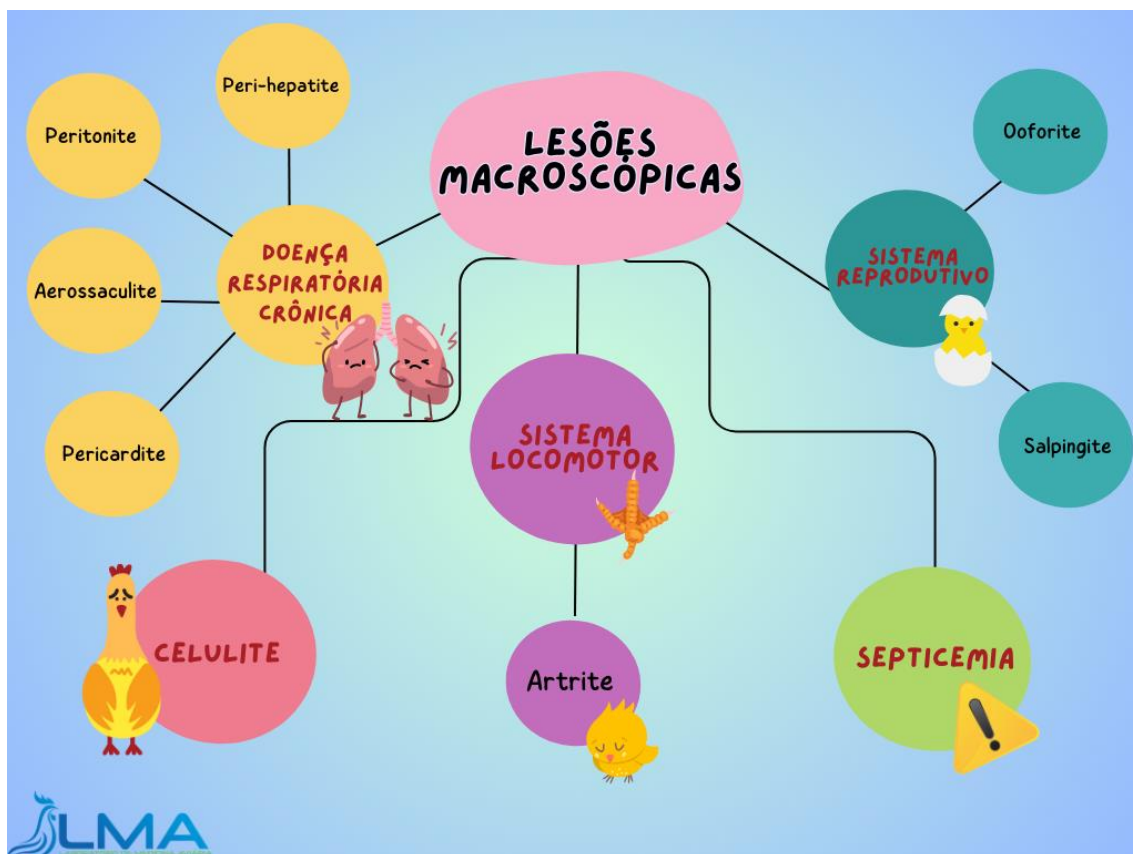


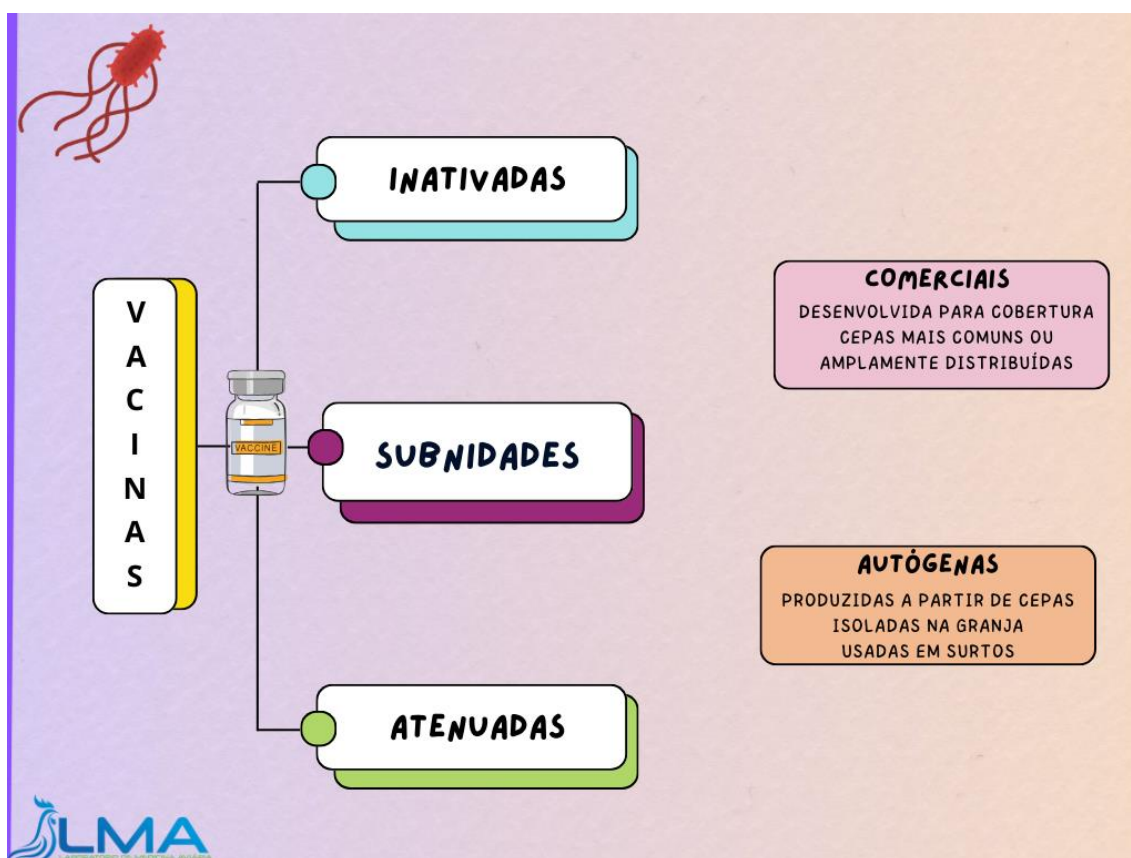
FATORES DEVIRULÊNCIA: adesinas, fímbrias, hemolisinas, toxinas e sideróforos











ALTERNATIVAS PARA CONTROLE DE APEC

PROBIÓTICOS



Micro-organismos vivos que, em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro

PRÉBIÓTICOS



Substâncias não digeríveis que estimulam a seletivamente o crescimento de microrganismos benéficos

BACTERIÓFAGOS



Vírus que infectam e destroem bactérias específicas



REFERÊNCIAS



CLERMONT, O. et al. 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, 2019. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>

JOHNSON, T. J. et al. Refining the definition of the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype through inclusion of high-risk clonal groups. *Poultry Science*, v. 101, n. 10, p. 102009, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102009>.

JOSEPH, J. et al. Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broiler Breeders with Colibacillosis in Mississippi. *Poultry*, v. 2, n. 1, p. 24–39, 2023. <https://doi.org/10.3390/poultry2010004>.

KATHAYAT, D. et al. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*, v. 10, n. 4, p. 467, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>.

NAWAZ, S. et al. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): current insights and future challenges. *Poultry Science*, v. 103, n. 12, p. 104359, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104359>.

SILVEIRA, L. A. S.; ARAÚJO, M. M. Mapas mentais na aprendizagem: um guia para professores. 1. ed. Vitória: Diálogo Comunicação e Marketing, 2023. Disponível em: https://repositorio.ivc.br/bitstream/handle/123456789/1742/Ebook%20Liza%20PUBLIC_ADO.pdf?sequence=1. Acesso em: Fev/2025

STEVANATO G. A.; BAPTISTA, A. A. S. APEC: UM DESAFIO PARA A INDÚSTRIA AVÍCOLA E SEU POTENCIAL ZOONÓTICO. *Revista Mundo Agro*, São Paulo, ano III, nº 6, pág. 28–30, dez. 2024. Disponível em: <https://www.avisite.com.br>. Acesso em: Fev/2025.



11 CONCLUSÕES

Os isolados de APEC caracterizados neste estudo:

- apresentaram perfil de resistência a antimicrobianos e resistência múltipla a drogas;
- os isolados não apresentaram capacidade de produção de β -lactamase de espectro estendido;
- os cinco genes (*iroN*, *iutA*, *iss*, *ompT*, *hlyF*) avaliados apresentaram um perfil de virulência com detecção de pelo menos três genes de virulência;
- foi detectado isolados com perfil sugestivo de clones de alto risco e
- o *pool* de *Lactobacillus* spp. apresentou efeito antagonista satisfatório frente a todas os isolados de APEC avaliada;
- o material complementar, Coletânea de mapas mentais: colibacilose aviária elaborado e registrado, facilitou o acesso à informação técnica-científica pelos profissionais da avicultura.