



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE
ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* E *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ORIUNDAS DE AMBIENTES DE
ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS E ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL**

EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

ABRIL/2025



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE
ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* E *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ORIUNDAS DE AMBIENTES DE
ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS E ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL**

EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO

ORIENTADORA: ANGELA PATRÍCIA SANTANA

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E
PATOLOGIA VETERINÁRIA**

**LINHA DE PESQUISA: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E
CONTROLE DE DOENÇAS DOS ANIMAIS E GESTÃO DOS
RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA**

BRASÍLIA-DF

ABRIL/2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE ESTIRPES DE
ESCHERICHIA COLI E *LISTERIA MONOCYTOGENES* ORIUNDAS DE
AMBIENTES DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS E ALIMENTOS DE
ORIGEM ANIMAL**

EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

ANGELA PATRÍCIA SANTANA, doutora (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)

SIMONE PERECMANIS, doutora (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)

CRISTIANO SALES PRADO, doutor (Universidade Federal de Goiás)
(EXAMINADOR EXTERNO)

MARCOS BRYAN HEINEMANN, doutor (Universidade de São Paulo)
(EXAMINADOR EXTERNO)

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

AGOSTINHO DAVANZO, E. F. **Caracterização de marcadores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* oriundas de ambientes de abatedouros frigoríficos e alimentos de origem animal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 156p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Aos meus animais, que fazem a vida valer a pena ser vivida. À minha família, pelo estímulo para estudar, que me trouxe até onde estou. À minha irmã e minha avó, as duas pessoas que eu mais amo na vida, meu muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório, Hayanna e Gabriel, cujos auxílios foram centrais para a execução desse trabalho. Ao ex-colega de laboratório, Virgílio, que continuou auxiliando na execução desse trabalho e no apoio moral, muito obrigada!

Muito obrigada aos membros do laboratório de Terapia Gênica e do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB, Fran, Maurício, Clea, Ernane, professor Ricardo e professora Simone, que foram imprescindíveis para a completa execução desse trabalho.

Muito obrigada aos estagiários que passaram pelo LAMAL ao longo dos últimos quatro anos, cujo auxílio e companhia facilitaram minha vida. Às minhas colegas de pós-graduação, Rebecca e Nataly, agradeço muito pelo apoio constante que recebi.

Aos meus amigos Rafael, Vivi (ambas), Eliza, Luana e Pedro, por me oferecerem o suporte social que eu tanto precisei ao longo dos últimos anos, muito obrigada!

Aos pesquisadores doutores Margareti, Bruno e Dallago pelo auxílio na execução experimental e análise de dados deste trabalho, muito obrigada!

Obrigada à FAP-DF e ao PROAP/UnB, que possibilitaram a execução dessa pesquisa através de auxílio financeiro, e obrigada ao PPSA da UnB por todo o apoio recebido enquanto discente deste programa.

Agradeço à banca examinadora, por aceitarem fazer parte desse momento, e à minha orientadora, professora Angela, que me acolheu no LAMAL e me apoiou na minha carreira desde o início. Obrigada por todo o apoio, todos os cafés, todas as conversas, todo o auxílio técnico e psicológico, e toda a paciência, especialmente nos momentos mais difíceis.

Esses últimos anos foram muito mais fáceis por causa do apoio de todos, em todos os sentidos. Meus mais sinceros agradecimentos a cada um de vocês!

RESUMO

A caracterização de microrganismos potencialmente patogênicos como *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos, de carcaças e de alimentos de origem animal, é uma importante ferramenta para a avaliação e mitigação de riscos para a população no contexto multidisciplinar da Saúde Única. O presente estudo objetivou realizar a caracterização genotípica e fenotípica de *E. coli* a partir da detecção de genes de virulência e resistência antimicrobiana (RA), análise filogenética por RAPD, fenótipo de RA e produção de ESBLs, padrões de adesão e capacidade de adesão em células Caco-2, produção de curli e celulose e capacidade de formação de biofilme *in vitro* e comparar as características dos isolados oriundos de fontes ambientais, de carcaças e de alimentos. A pesquisa e caracterização de *L. monocytogenes* foi realizada pela sorotipagem, detecção genotípica e fenotípica de RA, capacidade de adesão e invasão celular, sequenciamento do gene *inlA* e capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Foram detectados 5 patótipos de *E. coli*, com maior ocorrência de STEC, apresentando alta heterogeneidade dentre as estirpes nas características analisadas. Detectou-se alta ocorrência de multirresistência e produção de ESBL, além da produção de curli e celulose na maioria dos isolados. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme em pelo menos uma das condições de temperatura e tempo de incubação analisadas. Foram detectados padrões de adesão LA, AA e DA em cultivo de células Caco-2. Não houve associação entre padrão de adesão celular, capacidade de adesão celular, produção de curli ou celulose e capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Isolados oriundos de fontes de ambientes de abatedouros frigoríficos apresentaram melhor capacidade de formação de biofilme *in vitro*, quando comparado com isolados oriundos de carcaças suínas e alimentos de origem animal. O isolado de *L. monocytogenes* apresentou alta capacidade de adesão e invasão celular em células Caco-

2, e ausência de PMSCs no gene *inlA*. Foi detectada multirresistência antimicrobiana e capacidade de formação de biofilme *in vitro* em todas as condições testadas para esse microrganismo. Os resultados do presente estudo evidenciaram a ampla variabilidade de isolados de *E. coli* em circulação nas fontes analisadas, com presença de genes de virulência, altas taxas de RA e MRA e capacidade de formação de biofilme. Os resultados também detectaram a circulação de isolado de *L. monocytogenes* potencialmente patogênico, multirresistente e capaz de formar biofilme *in vitro* oriundo de alimento de origem animal pronto para consumo. Esses resultados demonstram o risco presente na indústria de produção de alimentos de origem animal, em relação à disseminação de isolados potencialmente patogênicos e com RA, os quais são importantes para a avaliação e vigilância em saúde pública.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, resistência antimicrobiana, Caco-2, curli, celulose, biofilme, Saúde Única.

ABSTRACT

The characterization of potentially pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*, originating from slaughterhouse environments, carcasses and animal-derived food, plays a critical role in risk assessment and mitigation for public health, aligned with the multidisciplinary One Health approach. This study aimed to perform genotypic and phenotypic characterization of *E. coli* by detecting virulence and antimicrobial resistance (AMR) genes, phylogenetic analysis via RAPD, antimicrobial resistance profiling, ESBL production, adhesion patterns and adherence capacity in Caco-2 cells, curli and cellulose production, and *in vitro* biofilm formation. Additionally, the characteristics of isolates from environment, carcasses and food sources were compared. For *L. monocytogenes*, research and characterization included serotyping, genotypic and phenotypic detection of AMR, cellular adhesion and invasion capacity, *inlA* gene sequencing, and *in vitro* biofilm formation. Five pathotypes of *E. coli* were isolated, with STEC strains representing the most abundant pathotype. High heterogeneity was observed among strains regarding the traits analyzed. A high occurrence of multidrug resistance (MDR) and ESBL production was detected, along with curli and cellulose production in most isolates. All isolates were capable of biofilm formation under at least one of the tested temperature and incubation time conditions. LA, AA, and DA adhesion patterns were observed in Caco-2 cell cultures. No association was found between cellular adhesion patterns, adherence capacity, curli/cellulose production, and *in vitro* biofilm formation. Isolates from environmental sources exhibited better *in vitro* biofilm-forming capacity compared to those from swine carcasses and animal-derived foods. The *L. monocytogenes* isolate demonstrated high cellular adhesion and invasion capacity in Caco-2 cells, with no PMSCs detected in the *inlA* gene. It showed

multidrug resistance and the ability to form biofilms under all tested conditions. The results highlight the extensive variability of *E. coli* isolates circulating in the analyzed sources, carrying virulence genes, high rates of AMR/MDR, and biofilm-forming capacity. Additionally, the detection of a potentially pathogenic, MDR, and biofilm-forming *L. monocytogenes* strain from ready-to-eat food underscores the risks within the animal-derived food production industry. These findings emphasize the risks in the animal-derived food production industry regarding the dissemination of potentially pathogenic and antimicrobial-resistant isolates, which are crucial for enhanced public health surveillance and risk assessment.

Keywords: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, antimicrobial resistance, Caco-2, curli, cellulose, biofilm, One Health.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1.Objetivo geral.....	18
3.2.Objetivos específicos.....	18
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4.1.Características do microrganismo <i>Escherichia coli</i>	20
4.2.Características do microrganismo <i>Listeria monocytogenes</i>	23
4.3.Biofilmes na indústria de alimentos de origem animal.....	24
4.4.Resistência antimicrobiana no contexto da saúde pública.....	28
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1.Origem das estirpes.....	30
5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	30
5.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	32
5.2.Cultivo e isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
5.3.Caracterização molecular por <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) (RAPD).....	33
5.4.Sorotipificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
5.5.Pesquisa de marcadores de virulência nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	36
5.6.Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana.....	38
5.7.Detecção de produção de curli e celulose nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	41
5.8.Pesquisa da capacidade e padrões de adesão celular de isolados de <i>Escherichia coli</i> em células da linhagem Caco-2.....	42
5.9.Pesquisa de adesão e invasão celular em células Caco-2 dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
5.10. Sequenciamento do gene <i>inlA</i> de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
5.11. Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i>	46
5.12. Análise estatística.....	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1.Isolamento e análise de <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	48
6.1.1. Análise dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	48
6.1.2. Análise do isolado de <i>Listeria monocytogenes</i>	50
6.2.Detecção de marcadores de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i>	51
6.3.Detecção de genótipos por RAPD dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	57
6.4.Detecção de sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i>	61
6.5.Antibiograma, detecção de genes de resistência antimicrobiana e produção de Beta-lactamases de Amplo Espectro dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	62

6.6. Antibiógrama e detecção de genes de resistência antimicrobiana de <i>Listeria monocytogenes</i>	86
6.7. Detecção da expressão de curli e celulose nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	88
6.8. Avaliação do padrão de adesão de isolados de <i>Escherichia coli</i> em células da linhagem Caco-2.....	97
6.9. Avaliação da capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2 dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	105
6.10. Avaliação da capacidade de adesão e invasão celular de <i>Listeria monocytogenes</i> em células da linhagem Caco-2.....	109
6.11. Sequenciamento do gene <i>inlA</i> de <i>Listeria monocytogenes</i>	110
6.12. Pesquisa de capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i>	111
6.13. Pesquisa de capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> de <i>Listeria monocytogenes</i>	124
7. CONCLUSÕES	126
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXO I	145
ANEXO II	154
ANEXO III	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Novo modelo expandido de formação de biofilmes. Adaptado de SAUER et al. (2022).	26
Figura 2- Dendograma construído pelo método UPGMA com coeficiente de DICE a 1,5% dos padrões RAPD oriundos dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i> analisados.....	59
Figura 3 – Morfotipos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> observados no teste do Vermelho Congo. A: estirpe 50EC (RDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. B: estirpe 125EC (BDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. C: estirpe 86EC (PDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. D: estirpe 67EC (SAW) após 24 horas de incubação a 37°C.....	90
Figura 4 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão localizada (LA). Isolado 36EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125µM.....	98
Figura 5 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão difusa (DA). Isolado 33EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125µM.....	99
Figura 6 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão agregativa (AA). Isolado 17EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125µM.....	100
Figura 7 – Capacidade de adesão celular (%) e desvio padrão em células da linhagem Caco-2 dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i>	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Identificação da estirpe, origem, local de detecção da amostra, região e ano de isolamento dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i>	31
Quadro 2- <i>Primers</i> utilizados para determinação de sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Quadro 3- <i>Primers</i> utilizados para detecção de genes de virulência e sorotipos em isolados de <i>Escherichia coli</i>	36
Quadro 4- Genes relacionados à resistência antimicrobiana pesquisados nos isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da pesquisa de marcadores de virulência presentes nos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i> oriundos de diferentes ambientes de produção de alimentos de origem animal e alimentos de origem animal.....	52
Tabela 2- Resultados do antibiograma por teste de difusão em disco, pesquisa de genes de resistência antimicrobiana, detecção de produção de ESBL e detecção de isolados multirresistentes dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i>	65
Tabela 3- Resultados do antibiograma pelo método de difusão em disco dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	87
Tabela 4- Resultados de morfotipo e expressão de curli e celulose no teste do Vermelho Congo dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i> analisados na temperatura de 37°C após 24, 48 e 72 horas de incubação.....	91
Tabela 5- Resultados de morfotipo e expressão de curli e celulose no teste do Vermelho Congo dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i> analisados na temperatura de 24°C após 24, 48 e 72 horas de incubação.....	93
Tabela 6 - Resultados da avaliação do padrão de adesão em células da linhagem caco-2 dos 31 isolados de <i>Escherichia coli</i>	101
Tabela 7 - Resultados da classificação da capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> individual de acordo com o protocolo descrito por STEPANOVIĆ et al. (2000) sob 10°C, 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas de incubação, e dos morfotipos detectados pelo teste do Vermelho Congo dos isolados de <i>Escherichia coli</i> submetidos às incubações de 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas.....	112
Tabela 8- Resultados de origem, patotipo, capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> a 37°C, expressão de curli e celulose a 37°C, capacidade de adesão celular e padrão de adesão celular em células Caco-2, detecção de genes de virulência, detecção do gene <i>ampC</i> , Multirresistência antimicrobiana e detecção fenotípica de produção de ESBLs dos isolados de <i>Escherichia coli</i> 16EC, 39EC, 50EC, 68EC, 75EC, 116EC, 134EC e 140EC.....	121
Tabela 9 - Resultado da classificação da capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> de acordo com o protocolo descrito por STEPANOVIĆ et al. (2000), do isolado de <i>Listeria monocytogenes</i> submetidos a incubação a 10°C, 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas.....	125

1. INTRODUÇÃO

Doenças de origem alimentar são causas de altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, afetando não apenas indivíduos, mas aspectos econômicos de países, especialmente países em desenvolvimento (WHO, 2015; PIRES et al., 2021; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2023). Bactérias com potencial patogênico como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) estão comumente envolvidas em casos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) (BRASIL, 2010; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2023; EFSA; ECDC, 2023), e sua presença ao longo da cadeia de produção de alimentos de origem animal pode representar riscos para o consumidor (GALIÉ et al., 2018; RATHER et al., 2021).

E. coli são microrganismos comumente comensais, presentes na microbiota de diversos seres vivos (TENAILLON et al., 2010; RILEY, 2020). Porém, mecanismos de transferência horizontal de genes de virulência levaram ao desenvolvimento de linhagens patogênicas, denominadas patotipos (DOBRINDT, 2005; DENAMUR et al., 2021), que expressam fatores de colonização distintos das linhagens comensais, explorando receptores alternativos presentes na mucosa intestinal (PEREIRA; GIUGLIANO, 2013; DENAMUR et al., 2021), apresentando padrões de aderência característicos em superfícies celulares (SCALETSKY et al., 1984; NATARO et al., 1987). É o agente etiológico mais comumente identificado em surtos de DTHA no Brasil, perfazendo 34,8% dos casos com agente etiológico identificado entre 2014 e 2023 (BRASIL, 2024a).

Curli são estruturas amiloides funcionais expressas na superfície de bactérias gram-negativas como a *E. coli*, cujo papel na formação de biofilmes é bem estabelecido na literatura (OLSÉN et al., 1998; PAWAR; ROSSMAN; CHEN, 2005). A celulose,

outra estrutura extracelular produzida por esses microrganismos, é uma das responsáveis pela estruturação e proteção do biofilme, e também tem sua expressão possivelmente relacionada à capacidade de resistência a estresses ambientais em *E. coli* (GUALDI et al., 2008; LIMOLI, JONES, WOZNIAK, 2015), e a ação sinérgica das duas estruturas podem estar relacionadas com colonização de hospedeiros, formação de biofilme e capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes (SALDAÑA et al., 2009).

Um dos principais fatores de virulência da *L. monocytogenes* é a interação entre internalina-A e E-caderina (LECUIT et al., 2001), que depende da integridade do gene *inlA* (OLIER et al., 2005). A presença de stop-codons prematuros (PMSCs) nesse gene tem sido relacionada a clones com menor potencial patogênico em função da menor capacidade de invasão celular, sendo os PMSCs mais comumente detectados em amostras de origem alimentar, quando comparado com amostras clínicas (NIGHTINGALE et al., 2005).

A resistência antimicrobiana (RA) é atualmente um dos principais desafios enfrentados pela saúde pública, causando grandes impactos socioeconômicos através das perdas de vidas humanas e animais, aumento de gastos com saúde e perda de produtividade (MURRAY et al., 2022; FAO, 2023a), e o fortalecimento da vigilância da RA é uma das principais ferramentas disponíveis para obtenção de dados para mitigação de riscos para a saúde pública (WHO, 2022a).

A presença de biofilmes na indústria de produção de alimentos é outro desafio para a saúde pública, levando a sérias ameaças por seus potenciais efeitos econômicos e na saúde da população, uma vez que a ocorrência de DHTAs pode estar associada à emergência de patógenos com capacidade de formação de biofilme dentro das indústrias de produção e processamento de alimentos (RATHER et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

Escherichia coli e *Listeria monocytogenes* são microrganismos de alto impacto na saúde pública em função de seu potencial patogênico, fácil disseminação e difícil controle ambiental (BRASIL, 2010; GALIÉ et al., 2018). A caracterização molecular de microrganismos patogênicos através de técnicas de alto poder discriminatório permite analisar aspectos de disseminação de clones em diferentes regiões e possivelmente traçar origens comuns (GOERING, 2010), contribuindo para tomadas de decisão dentro da indústria de produção de alimentos que levem à maior segurança alimentar e consequente proteção da saúde da população.

A caracterização de aspectos genotípicos e fenotípicos de microrganismos potencialmente patogênicos oriundos de alimentos e ambientes de produção de alimentos, como a presença de genes de virulência, capacidade de adesão e invasão celular, capacidade de formação de biofilme, expressão de curli e celulose e a avaliação dos padrões de adesão celular, são ferramentas que auxiliam na vigilância para avaliação de risco ao consumidor. A ocorrência de RA, especialmente relacionada a isolados que apresentem resistência a antimicrobianos de novas gerações, como cefalosporinas de terceira geração, e a ocorrência de multirresistência (MRA) são de especial interesse para a saúde pública (WHO, 2022a). Desse modo, a vigilância em RA realizada sobre a cadeia de produção de alimentos representa um dos pilares para a mitigação desse risco sob o contexto da interdisciplinaridade exigida pela óptica da saúde única (WHO, 2017; FAO, 2023b).

Alguns estudos brasileiros descreveram o isolamento de *L. monocytogenes* oriundos de alimentos de origem animal ou ambientes de produção desses alimentos (MENDONÇA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2013; CAMARGO et al., 2015; MAIA

et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2019; IGLESIAS et al., 2022). Porém, são poucos os estudos que caracterizam molecularmente isolados desse microrganismo no país e na região Centro-Oeste (ANDRADE et al., 2014; PALMA et al., 2016; OXARAN et al., 2017; RODRIGUES; DE SÁ; DE MELO, 2018). De modo semelhante, caracterização de isolados de *E. coli* de diferentes fontes tem sido descritas (FERREIRA et al., 2017; CASELLA et al., 2018; SANTIAGO et al., 2018; PINHEIRO et al., 2021; ROSARIO et al., 2021; DA SILVA et al., 2023), tendo ganhado especial importância em relação à implementação da IN 60 de 2018 do MAPA com a preconização da investigação dos sorogrupos O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BRASIL, 2018). Porém, não há estudos que caracterizem os padrões de adesão e invasão de isolados oriundos de alimentos e ambientes de produção de alimentos no país e na região do Distrito Federal e Entorno.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização de estirpes de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* oriundos de alimentos e ambientes de indústrias de produção de alimentos de origem animal quanto à presença de marcadores de virulência e em cultivos de células Caco-2.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização molecular dos isolados de *E. coli* por RAPD oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos, aves e suínos, de carcaças suínas e de alimentos de origem animal;
- Realizar a sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*;
- Pesquisar genes de virulência presentes nos isolados de *E. coli*;
- Realizar nos isolados os testes de detecção fenotípica e de genes de resistência antimicrobiana por PCR;
- Pesquisar nos isolados de *E. coli* a produção fenotípica de ESBL e presença de ampC plasmidial;
- Detectar a presença de matriz curli e celulose em isolados de *E. coli*;
- Caracterizar os padrões de adesão de isolados de *E. coli* em cultivo de células Caco-2;
- Realizar ensaios de capacidade de adesão celular de isolados de *E. coli* em cultivos de células Caco-2;
- Realizar ensaios de adesão e invasão de isolados de *L. monocytogenes* em cultivo de células Caco-2;
- Sequenciar o gene *inlA* de isolados de *L. monocytogenes* para correlacionar com a capacidade de invasão celular;
- Realizar testes de capacidade de formação de biofilme dos dois microrganismos *in vitro*.
- Correlacionar as origens dos isolados e os fatores de virulência com os achados do cultivo em células Caco-2.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Características do microrganismo *Escherichia coli*

Escherichia coli são bastonetes gram-negativos anaeróbios facultativos comumente encontrados como comensais na microbiota intestinal de vertebrados (TENAILLON et al., 2010), e por isso são comumente utilizados como indicadores de contaminação fecal (NAVAB-DANESHMAND et al., 2018). Eventos de transferência horizontal de genes mediados por elementos genéticos móveis (plasmídeos, fagos, elementos integradores e conjugadores), inativação de genes incompatíveis com virulência e mutações no material genético que levam a mudanças funcionais levaram à evolução de linhagens de *E. coli* virulentas, potencialmente causadores de afecções intra e extra-intestinais em humanos e animais (DENAMUR et al., 2021). Linhagens com potencial patogênico, denominadas patotipos, podem ser classificadas a partir de diversas características, como o órgão-alvo ou hospedeiro da infecção, a presença de genes específicos, padrões de adesão celular, dentre outros (DENAMUR et al., 2021).

E. coli diarreicogênicas (DEC) são classificadas em seis patotipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (JESSER; LEVY, 2020). O patotipo ETEC é definido a partir da presença de enterotoxinas termoestáveis (*sta*) e termolábeis (*lt*), e possui como principais fatores de virulência genes de codificação de enterotoxinas, fatores de colonização e hemolisinas. EPEC é caracterizada pelas lesões *attaching and effacing* (adesão e apagamento) (A/E) nos enterócitos, e possui como principais genes de virulência os genes *eae* e *bfp*. STEC, que engloba também as *E. coli* enterohemorrágicas

(EHEC), é caracterizada pela presença de genes *stx*, podendo possuir também genes *eae* e *ehxA* (para EHEC). EIEC são caracterizadas pela capacidade de invasão de células epiteliais intestinais, com presença de genes como *ipa*, *isc* e *vir*. EAEC são caracterizadas por adesão agregativa nos enterócitos, com a presença de genes *aaf* e *agg*. Por fim, DAEC são caracterizadas por adesão difusa em enterócitos, com presença de genes relacionados a adesinas como *afa* e *dra* (JESSER; LEVY, 2020; DENAMUR et al., 2021). Além dos patotipos clássicos descritos, a alta taxa de variabilidade genética entre esses microrganismos levou à emergência de patotipos híbridos (*HyPEC*), que tem sido descritos recentemente na literatura (BRAZ et al., 2020).

Os principais padrões de adesão celular descritos na literatura são adesão localizada (LA), adesão agregativa (AA) e adesão difusa (DA) (SCALETSKY et al., 1984; NATARO et al., 1987; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013). A detecção do padrão AA é considerado padrão ouro para a detecção fenotípica de EAEC (FREIRE et al., 2022). Estudos de padrões de adesão em cultivo celular foram ferramentas essenciais para a determinação dos patotipos e para evidenciar a ampla variedade de fatores de colonização presentes nesses microrganismos (PEREIRA; GIUGLIANO, 2013). Dentre os tipos celulares utilizados para ensaios de adesão celular de isolados de *E. coli*, um dos mais utilizados são células de carcinoma de cólon humano da linhagem Caco-2 (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1990; COPPA et al., 2006; SAMPAIO et al., 2016).

A patogenicidade da *E. coli* é multifatorial e envolve elementos como adesinas, invasinas, alterações de superfície celular e produção de toxinas (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). A avaliação do potencial de virulência de isolados pode ser realizada através da pesquisa de genes-alvo relacionados a esses fatores (FIROOZEH et al., 2014; JAMALI; KRYLOVA; AİDER, 2018; NATARAJAN et al., 2018), uma vez que mesmo estirpes comensais podem agir como reservatórios de genes de virulência e

de RA dentro de seus habitats (TENAILLON et al., 2010). Os genes *stx-1* e *stx-2* codificam toxinas tipo Shiga e estão associados ao advento de linhagens STEC (DENAMUR et al., 2021). A presença especialmente do gene *stx-2* possui associação com doença com apresentação de quadro mais grave em humanos, particularmente o desenvolvimento da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (BOERLIN et al., 1999; DENAMUR et al., 2021). Essa classe de toxinas possui subtipos cuja presença pode ser clinicamente relevante, como a presença dos subtipos *stx2c* e *stx2d*, podendo indicar quadros clínicos mais graves em humanos, evoluindo para SHU (FRIEDRICH et al., 2002; BIELASZEWSKA et al., 2006; PERSSON et al., 2007).

A detecção de genes de virulência também auxilia na determinação de patótipos de *E. coli*, uma vez que a presença de genes de virulência específicos se relaciona com diferentes patótipos. Alguns exemplos são o gene *espP*, responsável pela produção de protease extracelular, que é comumente detectado em EHECs (BRUNDER; SCHMIDT; KARCH, 1997), a presença de genes codificadores de shiga-toxina (*stx-1*, *stx-2*), que se relacionam com patótipos STEC e que, quando estão associados ao gene *eae*, gene codificador de intimina necessária para a ligação do patótipo às células, relaciona-se com patótipo EHEC (DONNENBERG et al., 1993; BRAZ et al., 2020; DENAMUR et al., 2021). Contudo, a grande variabilidade genética e altas taxas de mutação observadas na espécie, levando inclusive ao surgimento dos patótipos híbridos, faz com que a determinação de patótipos seja complexa e envolva diversos fatores que vão além da presença e funcionalidade de genes de virulência, mas também envolvendo padrões de adesão celular, caracterização de lesões patológicas, e capacidade de patogenia em modelos *in vivo* (DENAMUR et al., 2021).

4.2. Características do microrganismo *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, bactéria gram-positiva ubiqüitária, é o principal agente etiológico da listeriose humana (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; DISSON; MOURA; LECUIT, 2021). É dividido em quatro linhagens distintas (I, II, III e IV) e 13 sorotipos com base em análises de variabilidade genética (PIFFARETTI et al., 1989; WARD et al., 2008). A linhagem I compreende os sorotipos 1/2b, 3b, 3c, e 4b; a linhagem II compreende os sorotipos 1/2a, 1/2c, e 3a; a linhagem III compreende os sorotipos 4a, 4b e 4c e a linhagem IV compreende os sorotipos 4a, 4b, e 4c atípicos (ORSI; BAKKER; WIEDMANN, 2011). Sorotipos pertencentes à linhagem I são mais comumente associados a amostras clínicas, enquanto sorotipos da linhagem II são mais comumente isolados de amostras de alimentos, sendo que os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b são responsáveis pela ampla maioria dos casos de listeriose (MCLAUCHLIN, 1990; PONTELLO et al., 2012; RAVINDHIRAN et al., 2023).

Diversos fatores de virulência podem estar presentes nesse microrganismo, dentre os quais proteínas de adesão, proteínas de invasão, elementos relacionados à lise de vacúolos e à disseminação célula-célula (LOPES-LUZ et al., 2021). Sua patogenia relaciona-se em especial com sua habilidade de aderir e invadir células através da interação inicial entre a proteína de membrana internalina A (inlA) e receptores do tipo E-caderina (LECUIT et al., 2001). Ensaios de adesão e invasão celulares associados com análises moleculares do gene *inlA* permitem a avaliação do potencial patogênico de isolados de diferentes fontes (NIGHTINGALE et al., 2005). Esses ensaios estão bem estabelecidos na literatura e são comumente realizados com o uso de células da linhagem Caco-2 (KUSHWAHA; MURIANA, 2010; KANKI et al., 2015; SU et al., 2019).

4.3. Biofilmes na indústria de alimentos de origem animal

Um importante aspecto da indústria de produção de alimentos de origem animal, que é causa de preocupação para a saúde pública, é a presença de biofilmes em ambientes de produção e/ou processamento dos alimentos, potencialmente permitindo a contaminação dos mesmos ao entrarem em contato com essas estruturas (RATHER et al., 2021; LI et al., 2022a). Bactérias que possuem a capacidade de se fixar em superfícies formam agregados adicionados de matriz polimérica produzida pelos próprios microrganismos, formando uma comunidade estruturada em um processo cíclico chamado biofilme, que permite um modo de crescimento protegido dos microrganismos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

Algumas pesquisas demonstraram a capacidade de formação de biofilmes dos microrganismos *E. coli* e *L. monocytogenes* isolados de ambientes de produção de alimentos de origem animal (DAVANZO et al., 2021; STANFORD et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022; LIU et al., 2022; YANG et al., 2023). Pesquisas tem sido conduzidas com o objetivo de se desenvolver métodos para mitigação de riscos relacionados à presença de biofilmes nas indústrias (MEVO et al., 2021; ALONSO et al., 2023). Nesse sentido, o monitoramento das indústrias para a presença de bactérias que possuem capacidade de formação de biofilme é uma ferramenta essencial para a proteção da saúde do consumidor (RATHER et al., 2021; ALONSO et al., 2023).

O mecanismo basal de formação de biofilmes é semelhante para diversos gêneros de microrganismos, apesar das diferenças moleculares e estruturais existentes entre diferentes espécies (SAUER et al. 2007; TOLKER-NIELSEN, 2015). A formação de biofilmes envolve um sistema de comunicação celular entre os microrganismos

denominado *quorum sensing* (QS), dependente da produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras, que se dividem em sistemas como autoindutor 1,2 e 3 (AI-1, AI-2, AI-3), peptídeos autoindutores (AIP), sRNAs, N-acil homoserina lactonas (AHL/HSL), peptídeos modificados pós-translação, miRNAs, siRNAs e outros (LASARRE; FEDERLE, 2013; FALÀ et al., 2022; WANG et al., 2022). Atualmente há grande interesse no estudo de QS associado à formação de biofilmes no contexto da indústria de alimentos, uma vez que estudos tem demonstrado que o QS é capaz de afetar a adaptação dos microrganismos a diferentes ambientes, além de se haver evidências de influência na qualidade dos alimentos (YUAN et al., 2018; LI et al., 2022b) e no contexto da RA por seu papel na transferência horizontal de genes (LU et al., 2017).

A capacidade de formação de biofilme dos microrganismos é um mecanismo de adaptação que traz vantagens ao promover proteção dos mesmos a adversidades ambientais, como adaptação a alterações de disponibilidade de nutrientes, pressão osmótica, temperatura, pH, e outros fatores (ZHOU et al., 2022). As fases de desenvolvimento de um biofilme envolvem a adesão inicial das bactérias à superfície (biótica ou abiótica) e entre si, com a subsequente formação de micro colônias, seguido pela maturação do biofilme e, ao final, dispersão do mesmo. Esse é o modelo conceitual tradicional de formação de biofilme (TOLKER-NIELSEN, 2015; SAUER et al., 2022). Recentemente, um novo modelo de esquematização de formação de biofilme foi proposto, englobando pontos que facilitam uma visualização mais dinâmica do processo (Figura 1) (SAUER et al., 2022).

A fase de adesão inicial é caracterizada por processos de ligação inicialmente reversíveis e posteriormente irreversíveis. Nessa fase, há ação de flagelos, responsáveis pela adesão inicial à superfície, e pili tipo IV, que possui papel na agregação e formação de micro colônias (RABIN et al., 2015). A nível molecular, a transição da fase

planctônica para a fase sésil é iniciada pelo aumento da síntese do mensageiro intracelular secundário diguanilato cíclico (c-di-GMP) em resposta a estímulos ambientais, que por sua vez induz a produção de adesinas e produtos de matriz extracelular (SIMM et al., 2004; TOLKER-NIELSEN, 2015). A fase de adesão irreversível se caracteriza pela produção de matriz de substância polimérica extracelular (SPE) composta de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA), celulose, fibras amiloides e não amiloides e lipídeos (FLEMMING et al., 2023). A produção dos diversos componentes da matriz de SPE é feita pelos próprios microrganismos, e relaciona-se com o tipo de microrganismos presentes no biofilme, com a disponibilidade e tipo de nutrientes presentes e com as condições ambientais nas quais se encontram (FLEMMING et al., 2023).

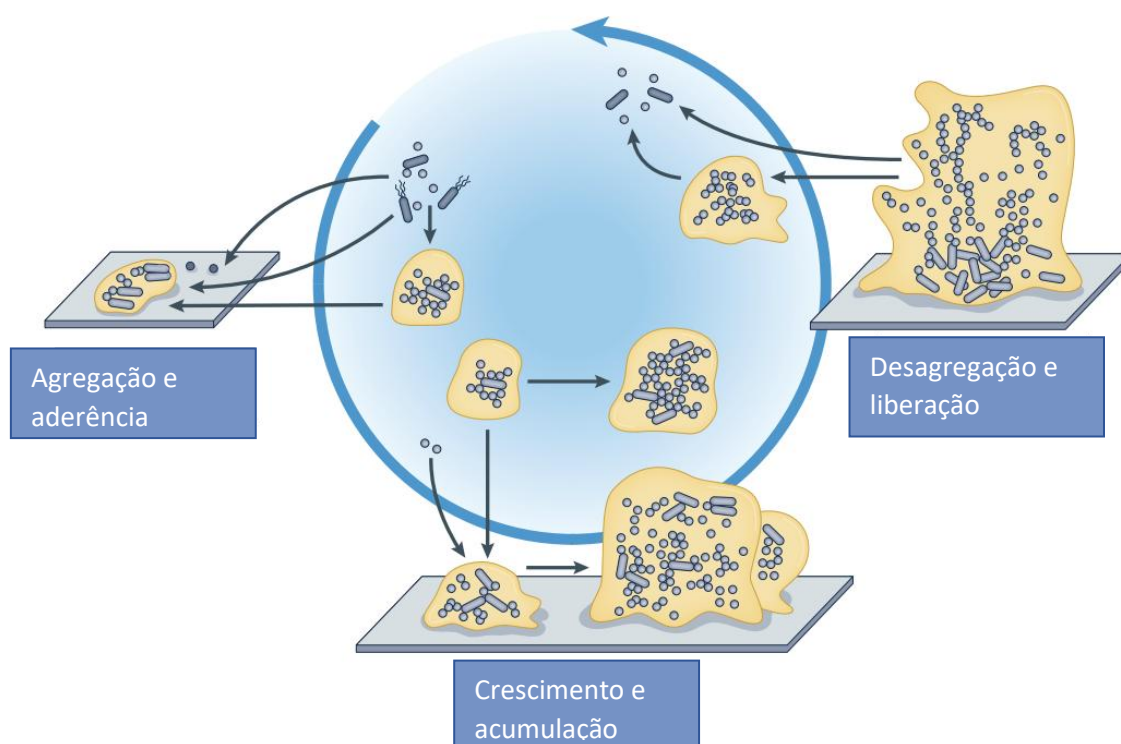


Figura 1- Novo modelo expandido de formação de biofilmes. Adaptado de SAUER et al. (2022).

Dentre os elementos presentes na matriz de SPE, a celulose (poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicose) e proteínas amiloides possuem papel na formação e estruturação do biofilme, e por isso são frequentemente pesquisadas como indicadores da capacidade de formação de biofilme de microrganismos (PAWAR; ROSSMAN; CHEN, 2005; SALDAÑA et al., 2009; REICHHARDT et al., 2015; CIMDINS; SIMM, 2017; TRMCIC et al., 2018), potencialmente possuindo ações sinérgicas no aumento da capacidade de formação de biofilmes (SALDAÑA et al., 2009). A celulose é um polissacarídeo identificado como um componente fundamental que influencia a morfologia e arquitetura dos biofilmes (FLEMMING et al., 2023). Sua produção é feita através do operon *bcs* (bacterial cellulose synthesis), que codifica proteínas responsáveis pela biossíntese desse polímero (*bcsA*, *bcsB*, *bcsC*, *bcsD*). Essas expressões são por sua vez reguladas pelo mensageiro intracelular c-di-GMP (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; HU et al., 2015; RÖMLING; GALPERIN, 2015). Curli são fibras amiloides funcionais produzidas por diversas bactérias entéricas, formadas por duas subunidades, *csgA* e *csgB* (DEBENEDICTIS; MA; KETEN, 2017; SMITH et al., 2017), cujo sistema de montagem é feito por genes *csg* arranjados em operons *csgDEFG* e *csgBAC* (HAMMAR et al., 1995; SMITH et al., 2017). As propriedades bioquímicas desses dois elementos fazem com que os mesmos se liguem ao corante Vermelho Congo (VC). Essa propriedade permite a visualização da depleção do corante e do fenótipo das colônias quando cultivadas em ágar suplementado com VC, fazendo deste um método rápido e fácil de ser implementado na pesquisa de presença de elementos relacionados à capacidade de formação de biofilmes de enterobactérias (REICHHARDT et al., 2015; CIMDINS; SIMM, 2017).

Além do papel do biofilme como possível perpetuador de bactérias com potencial patogênico em ambientes de produção de alimentos, outro fator de preocupação

relacionado ao mesmo é seu papel como facilitador de transferência de material genético entre microrganismos, sendo assim um fator envolvido na disseminação da RA (SILVA-DE-JESUS et al., 2022), que se caracteriza atualmente como um importante risco para a saúde pública.

4.4. Resistência antimicrobiana no contexto da saúde pública

A resistência antimicrobiana (RA) se caracteriza atualmente como um importante risco para a saúde pública, ao ponto de ser classificado em 2019 pela Organização Mundial da Saúde como uma das dez maiores ameaças à saúde pública (WHO, 2022a). O desenvolvimento de RA pode ocorrer quando, em resposta a pressões de seleção como o uso de biocidas, pesticidas, poluição e medicamentos, há transferência de genes relacionados à RA através de transformação, transdução ou conjugação, e também pela transferência genética relacionada a sequências de inserção, cassetes e transposons, que podem inserir genes de RA a elementos genéticos móveis como plasmídeos, facilitando a disseminação desses genes entre microrganismos (DJORDJEVIC et al., 2024). Os mecanismos de RA envolvem a capacidade de destruir ou modificar moléculas antimicrobianas, modificações em enzimas de ativação, alterações de ponto-alvo da droga, e redução na acumulação da molécula através de diminuição da permeabilidade ou elevação no efluxo, e também como resultado de uma adaptação global da célula bacteriana (CHRISTAKI et al., 2020). Alguns fatores relacionados à emergência dessa ameaça incluem a utilização inadequada de antimicrobianos no contexto clínico humano e animal, e no contexto da agroindústria (TANG et al., 2023; DJORDJEVIC et al., 2024). Essa natureza multisetorial e interconectada entre saúde humana, saúde animal e meio ambiente leva à necessidade de ações coordenadas sob uma perspectiva de Saúde

Única na busca pela mitigação dos riscos associados à emergência da RA (DJORDJEVIC et al., 2024). Dentre as ações a serem implementadas com esse objetivo está a vigilância da RA dentro das diferentes frentes de enfrentamento da ameaça da RA, cujos resultados servem para auxiliar nas tomadas de decisão a nível regional, nacional e internacional para mitigação de riscos (WHO, 2022a).

As pressões de seleção que contribuem para a acentuação da emergência da RA também podem levar ao surgimento de isolados que apresentem multirresistência antimicrobiana (MRA), que se define pela presença de resistência a pelo menos três classes distintas de antimicrobianos em um mesmo microrganismo (EFSA; ECDC, 2024). O surgimento de isolados multirresistentes intensifica os riscos à saúde pública, dificultando tratamentos e sendo um grande desafio na clínica médica, uma vez que a velocidade de desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas não é capaz de acompanhar o advento de isolados multirresistentes (TANWAR et al., 2014; SHARMA et al., 2022; DJORDJEVIC et al., 2024).

Outro fator de importância para a saúde pública relacionado à RA é a disseminação de microrganismos capazes de produzir β -lactamases de amplo espectro (ESBLs), que conferem resistência a penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e aztreonam através da hidrólise desses antimicrobianos, e é frequentemente observada em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em especial *E. coli* e *Klebsiella* sp (PATERSON; BONOMO, 2005; MASEDA; DE LA RICA, 2022; HUSNA et al., 2023). Há uma ampla variedade de genes relacionados à produção de ESBLs, que são divididos em famílias, como os grupos TEM, SHV, CTX-M, CMT, dentre outros (CASTANHEIRA et al., 2021). A disseminação de isolados produtores de ESBLs é causa de preocupação, uma vez que a distribuição de clones carreadores desses genes podem contribuir com a patogenicidade e riscos à saúde (FUGA et al., 2022).

Além disso, a ineficiência dessas classes de antimicrobianos no combate à infecções causadas por organismos produtores de ESBLs leva à necessidade de uso de classes mais restritas de antimicrobianos, e essas infecções podem levar a maiores custos de hospitalização, piores prognósticos e maiores taxas de mortalidade (MASLIKOWSKA et al., 2016).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Origem das estirpes

5.1.1. *Escherichia coli*

Foram analisadas 31 estirpes de *E. coli* pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, das quais 26 foram obtidas entre os anos de 2017 e 2021, e outras 5 entre os anos de 2022 e 2023. Desses isolados, 23 foram selecionados em função da presença de genes relacionados à shiga toxina, enquanto os outros 07 não passaram por critérios de seleção, tendo sido escolhidos aleatoriamente. Os microrganismos foram oriundos de carcaças suínas (08 isolados), e de ambientes de abatedouros-frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e Entorno, sendo 07 estirpes obtidas de abatedouros frigoríficos de bovinos, 05 estirpes obtidas de abatedouros frigoríficos de aves e 09 de abatedouros frigoríficos de suínos. Foram também analisadas 02 estirpes oriundas de alimentos de origem animal, sendo 01 detectado em queijo minas tipo padrão e outro em linguiça suína. Os 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo estão discriminados no Quadro 1.

Quadro 1- Identificação da estirpe, origem, local de detecção da amostra, região e ano de isolamento dos 31 isolados de *Escherichia coli*.

Identificação do isolado	Origem	Local de detecção	Região de isolamento	Ano de isolamento
3EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Caixa plástica branca	DF	2018
5EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Parede sala de abate	DF	2018
16EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Caixa plástica branca	GO	2018
17EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Caixa plástica branca	GO	2018
33EC	Ambiente de abatedouro de aves	Ralo área limpa	GO	2018
36EC	Ambiente de abatedouro de aves	Esteira de cortes de frango	GO	2018
37EC	Ambiente de abatedouro de aves	Esteira de cortes de frango	GO	2018
39EC	Ambiente de abatedouro de aves	Esteira de cortes de frango	GO	2018
50EC	Ambiente de abatedouro de aves	Calha embalagem	GO	2018
67EC	Carcaça de suínos	Barriga	DF	2021
68EC	Carcaça de suínos	Pernil	DF	2021
74EC	Carcaça de suínos	Lombo	DF	2021
75EC	Carcaça de suínos	Axila/paleta	DF	2021
83EC	Carcaça de suínos	Pernil	DF	2021
86EC	Carcaça de suínos	Pernil	DF	2021
88EC	Carcaça de suínos	Pernil	DF	2021
91EC	Carcaça de suínos	Barriga	DF	2021
115EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Chute de vísceras	DF	2021
116EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Ralo área suja	DF	2021
117EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Mesa de vísceras	DF	2021
119EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Piso câmara de resfriamento	DF	2021
122EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Depiladeira	DF	2021
125EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Faca de sangria	DF	2021
130EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Parede área suja	DF	2021

131EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Piso câmara de resfriamento	DF	2021
134EC	Ambiente de abatedouro de suínos	Serra de carcaça	DF	2021
136EC	Queijo minas padrão	Comércio do DF	DF	2022
137EC	Linguiça suína	Comércio Entorno do DF	GO	2022
138EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Plataforma pré crural	GO	2023
139EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Plataforma da toaleta	GO	2023
140EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	Ralo da sangria	GO	2023

5.1.2. *Listeria monocytogenes*

Foi analisado 01 isolado de *L. monocytogenes* pertencente à bacterioteca do LAMAL, oriundo de amostra analisada na rotina do laboratório em 2018, cuja matriz era carne cozida de frango pronto para consumo. Com o objetivo de aumentar o número de amostras de isolados de *L. monocytogenes*, foram realizadas pesquisas deste microrganismo em amostras de alimentos de origem animal oriundos de indústrias, restaurantes, açougues e feiras de rua da região do Distrito Federal, sendo elas amostras de queijo minas padrão, salsicha, carne homogeneizada bovina, linguiça suína, embutido de frango, costela bovina e alimentos prontos para consumo de origem animal, totalizando 26 amostras de alimentos analisadas.

5.2. Cultivo e isolamento de *Listeria monocytogenes*

Para cultivo e isolamento de *L. monocytogenes*, foi utilizada a metodologia descrita por RYSER & DONNELLY (2013). As coletas de swabs ambientais foram desenvolvidas conforme descrito por NICOLAU & BOLOCAN (2014). Para amostras

de ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, de suínos e de bovinos, realizou-se coleta de esfregações de superfície de área de 25 cm², por meio de swabs (Kasvi®) estéreis em equipamentos, instalações e ambientes das indústrias, que foram acondicionados em solução de transporte de peptona de carne 0,1% (Kasvi®) e transportados sob refrigeração, em caixas isotérmicas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília, para posterior processamento das amostras, que foi realizado no mesmo dia de obtenção. Procedeu-se então para inoculação de 1 mL de solução de transporte em 10 mL de caldo UVM (Kasvi®) para enriquecimento seletivo de *Listeria* sp., que foi incubado em estufa bacteriológica (Quimis®) a 35°C por 24 horas. Procedeu-se então à inoculação de 1 mL de caldo UVM em 9 mL de caldo Fraser (Kasvi®), que foi incubado a 35°C por 24 horas em estufa bacteriológica (Quimis®). Amostras em que foi observada hidrólise da esculina foram repicadas em ágar MOX (Kasvi®), que foi posteriormente incubado a 35°C por 24 horas, em estufa bacteriológica (Quimis®). Colônias sugestivas de *L. monocytogenes*, com coloração esbranquiçada e halo enegrecido pela hidrólise da esculina, foram repicadas em ágar nutriente (Kasvi®) e procedeu-se com a coloração de Gram (Neoprov®), teste do turbilhonamento em microscópio (Opton®) por contraste de fase, testes bioquímicos (catalase, nitrato, VM/VP, D-xilose, L-rhamnose) e confirmação de gênero e espécie por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da espécie, com pesquisa do gene *prfA* segundo o protocolo descrito por KÉROUANTON et al. (2010).

5.3. Caracterização molecular por *Random Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) (RAPD)

Para a determinação de padrões moleculares para análise de similaridade genética entre os isolados de *E. coli* foi realizada a técnica de RAPD-PCR, que consiste na amplificação aleatória de sequências de DNA, a partir da utilização do minissatélite M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (HUEY; HALL, 1989), nas condições descritas por ROSSETTI & GIRAFFA (2005). Isolados de *E. coli* foram cultivados *overnight* em ágar nutriente (Kasvi®), e posteriormente colônias isoladas foram adicionadas em 40 µL de água MilliQ® e fervidas por 10 minutos para serem utilizadas como *template*. As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25µL, contendo 2,5µL de tampão 10X (Invitrogen®), 2,5µL de dNTPs 2mM (Invitrogen®), 0,8µL de MgSO₄ 50mM (Invitrogen®), 1,0µL de *primer* M13 a 10 pmol, 0,5µL de taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 5µL de *template*. As condições de amplificação foram um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 42°C por 20 segundos, e 72°C por 2 minutos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. A PCR foi executada em aparelho termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese a 45V por 90 minutos em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®), que foi corado com brometo de etídio (Ludwig®) a 0,6 µg/mL e visualizado em fotodocumentador (Major Science®). Foi utilizado o *software* gelJ para análise dos padrões de bandas com a utilização de marcador 100bp (Invitrogen®) (HERAS et al., 2015). Foi utilizado o método UPGMA com coeficiente de DICE a 1,5% para construção do dendrograma para análise da variabilidade genética entre os isolados de *E. coli* do presente estudo.

5.4. Sorotipificação de *Listeria monocytogenes*

A sorotipificação de *L. monocytogenes* foi realizada a partir da técnica de PCR descrita por DOUMITH et al. (2004), que permite a diferenciação em 4 grupos distintos (I-1/2a, 3a; II-1/2c, 3c; III-4b, 4d, 4e; IV- 1/2b, 3b) (DOUMITH et al., 2004). Realizou-se PCR multiplex com a utilização dos *primers* descritos no Quadro 2.

Quadro 2- *Primers* utilizados para determinação de sorotipos de *Listeria monocytogenes*.

Gene-alvo	Sequência de pares de base (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Sorotipos associados
Lmo0737	F-AGGGCTTCAAGGACTTACCC R-ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
Lmo1118	F- AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R- CGGCTTGTTCCGCATACTTA	906	1/2c, 3c
ORF2819	F- AGCAAAATGCCAAACTCGT R- CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
ORF2110	F- AGTGGACAATTGATTGGTGAA R- CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4d, 4e

Foi realizado cultivo *overnight* de *L. monocytogenes* em placas de ágar nutriente (Kasvi®), e colônias isoladas desse cultivo foram fervidas por 10 minutos em 40 µL de água MilliQ® para serem utilizadas como *template* com concentração de aproximadamente 2ng/µl. Foi realizada PCR multiplex em volume final de 25 µL, contendo 2,5µL de tampão 10X (Invitrogen®), 2,5µL de dNTPs 2mM (Invitrogen®), 0,8µL de MgSO₄ 50mM (Invitrogen®), 1,0µL de cada par de *primer* a 10 pmol, 0,5µL de taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 5µL de *template*. A PCR foi executada em aparelho termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems®) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 24 segundos, 53°C por 1,15 minutos e 72°C por 1,15 minutos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Foram aliquotados 5µL de produto da PCR para

realização de eletroforese adicionados de 3µL de tampão de corrida, que foram adicionados a gel de agarose (Invitrogen®) a 2% adicionado de brometo de etídio (Ludwig®) a 0,6µg/mL. A visualização das bandas foi realizada em aparelho fotodocumentador (Major Science®). A determinação da linhagem filogenética foi feita pela interpretação dos genes amplificados em cada isolado.

5.5. Pesquisa de marcadores de virulência nos isolados de *Escherichia coli*

Foram pesquisados por Reação em Cadeia da Polimerase os genes de virulência relacionados à produção de shiga-toxinas (*stx-1*, *stx-2*, *stx-2c*, *stx-2d*), intimina (*eae*), adesina (*saa*), protease (*espP*), hemolisina (*HlyA*) e receptores de intimina (*tir-α*, *tir-β*, *tir-γ*). Também foram pesquisados genes relacionados aos principais sorotipos patogênicos (O111, O113 e O157). Foram utilizados como controles positivos isolados pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília. Os *primers*, genes-alvo, as condições para as reações e referências estão listados no Quadro 3.

Quadro 3- *Primers* utilizados para detecção de genes de virulência e sorotipos em isolados de *Escherichia coli*.

Gene	Sequências dos <i>primers</i> (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>eaeA</i>	F- AGGCTTCGTCACAGTTG R-CCATCGTCACCAGAGGA	570	China et al., 1996
<i>espP</i>	F- AAACAGCAGGCACTTGAACG R- GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT	1830	Brunder et al., 1999
<i>hlyA</i>	F- GCATCATCAAGCGTACGTTCC R- AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Paton & Paton, 1998
<i>Saa</i>	F- CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	Paton & Paton, 2002

	R- ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>stx-1</i>	F- AGAGCGATGTTACGGTTTG R- TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	China et al., 1996
<i>stx-2</i>	F- TGGGTTTTTCTTCGGTATC R- GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China et al., 1996
<i>stx-2c</i>	F- GCGGTTTTTATTTGCATTAGT R- GTACTCTTTTCCGGCCACT	124	Wang et al., 2002
<i>stx-2d</i>	F- GGTAATAATTGAGTTCTCTAAGTAT R- CAGCAAATCCTGAACCTGACG	175	Wang et al., 2002
<i>tir-α</i>	F- CRCKCCAYTACCTTCACA R- CGCTAACCTCCAAACCATT	342	China et al., 1999
<i>tir-β</i>	F- CRCKCCAYTACCTTCACA R- TGTATGTCGCACTCTGATT	560	China et al., 1999
<i>tir-γ</i>	F- CRCKCCAYTACCTTCACA R- GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC	781	China et al., 1999
O111	F- TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC R- ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC	406	Paton & Paton, 1998
O113	F- AGCGTTTCTGACATATGGAGTG R- GTGTTAGTATCAAAAGAGGCTCC	593	Paton & Paton, 1999
O157	F- CGGACATCCATGTGATATGR R- TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259	Paton & Paton, 1998

A determinação de patotipos foi realizada através da detecção dos genes *stx* (*stx-1*, *stx-2*, *stx-2c* ou *stx-2d*) para classificação dos isolados em STEC; detecção dos genes *stx* associados ao gene *eae* para classificação em EHEC, e detecção do gene *eae* para classificação em EPEC (TOMA et al., 2003; DENAMUR et al., 2021; DE MELO TAVARES et al., 2024).

5.6. Antibiógrama e detecção de genes de resistência antimicrobiana

A determinação de resistência antimicrobiana (RA) fenotípica dos isolados de *E. coli* e *L. monocytogenes* foi avaliada pelo método de difusão em disco, conforme descrito pelo *Clinical And Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2025). As bases testadas para *E. coli* foram: Quinolonas - ácido nalidíxico (NAL) 30 µg, ciprofloxacino (CIP) 5 µg; Aminopenicilinas - amoxicilina (AMO) 10µg, ampicilina (AMP) 10 µg; Cefalosporinas - cefalexina (CFE) 30µg, cefazolina (CFZ) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg; Anfenicóis - cloranfenicol (CLO) 30µg; Tetraciclina - tetraciclina (TET) 30 µg, doxiciclina (DOX) 30 µg; Aminoglicosídeos - estreptomicina (EST) 10 µg, gentamicina (GEN) 10 µg; Sulfonamidas - sulfonamidas (SUL) 300µg. A classificação baseou-se nos pontos de corte definidos pelo CLSI M100 (CLSI, 2025) para *Enterobacteriaceae*. Para preparo do inóculo, 3 a 4 colônias de cultura com no máximo 24 horas de crescimento em ágar nutriente (Kasvi®) foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Kasvi®), que foi incubado em estufa bacteriológica (Quimis®) a 37°C até atingir turvação correspondente à 0,5 na escala McFarland (Probac®) (aproximadamente 1.5×10^8 células). Com o auxílio de um *swab* estéril (Kasvi®), uma placa de ágar Müeller Hinton (Kasvi®) foi semeada de maneira homogênea com cada isolado individualmente, e posteriormente discos de antimicrobianos foram dispostos sobre a mesma, com cada placa contendo no máximo 5 discos. Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 18 horas, os halos de inibição formados foram medidos por meio de réguas, e assim procedeu-se com a classificação de acordo com os valores descritos no CLSI M100 (CLSI, 2025).

Para detecção fenotípica de produção de β -lactamases de espectro expandido (ESBLs) e de *ampC* plasmidial nos isolados de *E. coli*, foram realizados os protocolos por disco aproximação descritos pelo Subcomitê Veterinário do *Brazilian Committee on*

Antimicrobial Susceptibility Testing- BrCASTvet (BRCASTVET, 2022). Os inóculos foram preparados de maneira similar ao descrito anteriormente para o método de difusão em disco. Para o teste de detecção de produção de ESBLs, foram dispostos 5 discos de antimicrobianos em uma placa de ágar Müller Hinton (Kasvi®) com 2,5 cm de distância entre eles (ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), cefepime (COM) e ceftazidima (CAZ) ao redor de amoxicilina/ácido clavulânico (AMC)). A produção de ESBLs foi considerada positiva quando houve observação do aumento do halo de inibição de qualquer uma das cefalosporinas em direção ao disco de AMC, ou se houve formação de “zona fantasma” entre os mesmos. Para a detecção de ampC plasmidial, o preparo do inóculo foi realizado como citado anteriormente, e foram dispostos na placa de Müller Hinton (Kasvi®) um disco de CAZ e um disco de imipenem (IPM) a 3 cm de equidistância. A produção de ampC plasmidial foi considerada presente quando se observou achatamento do halo de inibição da CAZ na face próxima ao disco de IPM.

Para *L. monocytogenes*, as bases antimicrobianas testadas foram Macrolídeos - eritromicina (ERI) 15 µg; β-lactâmicos – ampicilina (AMP) 10 µg, meropenem (MER) 10 µg; Quinolonas – ciprofloxacino (CIP) 5µg; Anfenicóis - cloranfenicol (CLO) 30µg; Tetraciclina - tetraciclina (TET) 30 µg, doxiciclina (DOX) 30 µg; Aminoglicosídeos - gentamicina (GEN) 10 µg; Sulfonamidas - sulfonamida (SUL) 300µg e sulfazotrim (SUT) 1,25 µg trimetoprim / 23,75 µg sulfametoxazol. A classificação utilizou os pontos de corte descritos no CLSI M100 (CLSI, 2025) para *Staphylococcus* spp. (CHEN et al., 2010) para todas as bases, exceto para AMP, ERI, MER e SUT, para as quais foram utilizados os pontos de corte descritos no Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para *L. monocytogenes* (BRCAST, 2025). O protocolo seguido para execução do teste foi o mesmo descrito para os isolados de *E. coli*.

A caracterização de marcadores genéticos relacionados à RA foi realizada a partir da detecção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos genes descritos no Quadro 4, bem como todos os protocolos para cada reação. Todos os genes-alvo foram testados para *E. coli* e *L. monocytogenes*, exceto os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* e *mcr-4*, que não foram testados para isolados de *L. monocytogenes*. Foram utilizados como controles positivos isolados pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília.

Quadro 4- Genes relacionados à resistência antimicrobiana pesquisados nos isolados de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Gene-alvo	Sequências dos primers (5' - 3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>mcr-1</i>	F- CGGTCAGTCCGTTTGTTTC R- CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	LIU et al., 2016
<i>mcr-2</i>	F- TGGTACAGCCCCCTTTATT R- GCTTGAGATTGGGTTATGA	1617	XAVIER et al., 2016
<i>mcr-3</i>	F- TTGGCACTGTATTTTGCATTT R- TTAACGAAATTGGCTGGAACA	542	YIN et al., 2017
<i>mcr-4</i>	F- ATTGGGATAGTCGCCTTTTT R- TTACAGCCAGAATCATTATCA	487	CARATTOLI et al., 2017
<i>tet(A)</i>	F- GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	887	VAN et al., 2008
<i>tet(B)</i>	F- CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	773	VAN et al., 2008
<i>tet(C)</i>	F- ACTTGGAGCCACTATCGAC CTACAATCCATGCCAACCC	880	VAN et al., 2008
<i>tet(M)</i>	F- GTTAAATAGTGTTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	700	AARESTRUP et al., 2000
<i>ermA</i>	F- TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	SUTCLIFFE et al., 1996
<i>ermB</i>	F- GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	SUTCLIFFE et al., 1996
<i>ermC</i>	TCAAAACATAATATAGATAAAAF-	642	SUTCLIFFE et al., 1996

	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT		
<i>ereA</i>	F- GCCGGTGCTCATGAACTTGAG CGACTCTATTCGATCAGAGGC	419	VAN et al., 2008
<i>cat1</i>	F- AGTTGCTCAATGTACCTATAACC R- TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	VAN et al., 2008
<i>cmlA</i>	F- CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC R- CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	698	VAN et al., 2008
<i>sulI</i>	F- TTCGGCATTCTGAATCTCAC R- ATGATCTAACCCTCGGTCTC	822	VAN et al., 2008
<i>blaSHV</i>	F- TCGCCTGTGTATTATCTCCC R- CGCAGATAAAATCACCACAATG	768	VAN et al., 2008
<i>ampC</i>	F- TTCTATCAAMACTGGCARCC R- CCYTTTTATGTACCCAYGA	550	SCHWARTZ et al., 2003
<i>aaC(3)-I</i>	F- ACCTACTCCCAACATCAGCC R- ATATAGATCTCACTACGCGC	157	VAN et al., 2008

5.7. Detecção de produção de curli e celulose nos isolados de *Escherichia coli*

A detecção fenotípica da presença de expressão de fímbria tipo curli e celulose nos isolados de *E. coli* foi realizada pelo método de ligação do Vermelho Congo (VC) a estruturas amiloides, conforme descrito por REICHHARDT et al. (2015). Uma colônia de cada isolado de *E. coli* foi repicada em placas de ágar YESCA (0,5g/L de extrato de levedura (Kasvi®); 10g/L de peptona de caseína (Kasvi®)) adicionado de 25µg/mL de solução de VC (Sigma Aldrich®) e incubadas a 24°C e 37°C, com leituras em 24, 48 e 72 horas de incubação. A interpretação do teste baseou-se na observação dos morfotipos descritos por CIMDINS & SIMM (2017), que são: SAW (*smooth and white* – liso e branco) – ausência de expressão de curli e celulose; RDAR (*red, dry and rough* – vermelha, seca e rugosa) – presença de curli e celulose; BDAR (*brown, dry and rough*

– marrom, seca e rugosa) – expressão de curli; PDAR (*pink, dry and rough* – rosa, seca e rugosa) – expressão de celulose.

5.8. Pesquisa da capacidade e padrões de adesão celular de isolados de *Escherichia coli* em células da linhagem Caco-2

As células da linhagem Caco-2 utilizadas no presente estudo foram oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), gentilmente cedidas pela professora doutora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araujo, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O cultivo de células da linhagem Caco-2 foi realizado conforme protocolo descrito por GAILLARD et al. (1987). A quantificação da capacidade de adesão celular foi realizada através da metodologia descrita por MORONI et al. (2006). As células foram mantidas utilizando-se meio DMEM high glucose (Gibco®) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e 1% de penicilina (100U/mL) - estreptomicina (10mg/mL) (Sigma-Aldrich®), denominado meio DMEM completo. As garrafas de 250mL (Kasvi®) foram mantidas em estufa de câmara de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ – Q316C) a 5% de concentração de CO₂ e 37°C, sendo tripsinizadas (0,25% Tripsina-EDTA (1X) – Sigma-Aldrich®) quando em confluência de 90%. Os ensaios foram executados em placas de 24 poços (Kasvi®) com número de $1,0 \times 10^5$ células por poço após aproximadamente 36 horas de incubação, alcançando confluência acima de 90%.

Para realização da avaliação do padrão de adesão, foi utilizado o protocolo descrito por HAERI et al. (2012). Procedeu-se com a retirada do meio DMEM completo dos poços, seguidos de 3 lavagens com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®) e inoculação de cada poço com $1,0 \times 10^7$ UFC de cada isolado, previamente incubado em

água Tryptic Soy Broth (TSB) (Kasvi®) adicionado de 2% de D-manose (Dinâmica®), em 250µL de meio DMEM incompleto (meio DMEM high glucose adicionado de 10% de SFB) para obtenção de uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa de CO₂ a 5% de CO₂ e 37°C. Procedeu-se com 3 lavagens dos poços com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®), fixação com 1mL de metanol (Dinâmica®) por 60 segundos, e coloração com 1mL de corante de Giemsa (Laborclin®). A observação dos padrões de adesão foi realizada por microscopia em sistema de captação de imagem celular EVOS FLoid Imaging System (ThermoFisher®). Os isolados que apresentaram o padrão de adesão agregativa (AA) foram classificados como EAEC e os isolados que apresentaram o padrão de adesão difusa (DA) foram classificados como DAEC (DENAMUR et al., 2021). Todos os testes foram realizados em duplicata, em pelo menos dois ensaios independentes.

Para o ensaio de quantificação de capacidade de adesão em células Caco-2 dos isolados de *E. coli*, realizou-se a retirada do meio DMEM completo dos poços, seguida de 3 lavagens com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®) e inoculação de cada poço com $1,0 \times 10^7$ UFC de cada isolado, previamente incubado em água infusão de cérebro e coração (BHI) (Kasvi®), em 250µL de meio DMEM incompleto (meio DMEM high glucose adicionado de 10% de SFB) para obtenção de uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As placas foram incubadas por 2 horas em estufa de CO₂ a 5% de CO₂ e 37°C. Procedeu-se com 3 lavagens dos poços com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®), adicionou-se 250µL de solução de lise (Triton 100X 0,1% - Sigma Aldrich®), seguido de nova incubação de 15 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente, e procedeu-se com o preparo das diluições para quantificação das células bacterianas viáveis por semeadora em água BHI (Kasvi®) pela técnica *drop-plate*. O resultado final foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL

(UFC/mL). A porcentagem de adesão bacteriana nas células Caco-2 foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ adesão} = \frac{\text{número de células bacterianas aderidas}}{\text{número de células aderidas ao poço}} \times 100$$

Todos os testes foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes. Os valores utilizados foram as médias das diferentes repetições para cada isolado.

5.9. Pesquisa de adesão e invasão celular em células Caco-2 dos isolados de *Listeria monocytogenes*

O cultivo de células da linhagem Caco-2 foi realizado conforme protocolo descrito por GAILLARD et al. (1987). Os ensaios de adesão foram desenvolvidos conforme metodologia descrita por MORONI et al. (2006), e os ensaios de invasão foram desenvolvidos conforme protocolo descrito por GAILLARD et al. (1987) e adaptado por MORONI et al. (2006). A manutenção das células e preparo das placas para os ensaios de adesão e de invasão seguiram os mesmos passos descritos anteriormente no ensaio de padrão de adesão celular e capacidade de adesão celular dos isolados de *E. coli*. Para os ensaios de adesão, foi seguido o mesmo protocolo descrito para os ensaios de capacidade de adesão celular dos isolados de *E. coli*. Para os ensaios de invasão celular, após as 2 horas de incubação dos inóculos sobre as células em uma MOI de 100, foram feitas 3 lavagens com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®) e adicionou-se 250µL de DMEM adicionado de 10% de SFB e solução de gentamicina 1mg/mL (Sigma-Aldrich®), com nova incubação nas mesmas condições de temperatura e

concentração de CO₂ descritas anteriormente por 1 hora. Posteriormente, procedeu-se com a fase de lise com a utilização de Triton 100X 0,1% (Sigma Aldrich®), semeadura e quantificação de maneira semelhante ao descrito para o ensaio de adesão celular dos isolados de *E. coli*. Todos os testes foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes. Os valores utilizados foram as médias das diferentes repetições.

5.10. Sequenciamento do gene *inlA* de *Listeria monocytogenes*

A detecção de fragmentos do gene *inlA* foi realizada através de PCR com utilização dos pares de *primers* O1/O2 e O3/O4, conforme protocolo descrito por POYART et al. (1996), para detecção da unidade de repetição A (1157pb, *primer* O1 - 5'-GAATGTAACAGACACG-3' e O2 - 5'-GAATGTAACAGACACG-3') e unidade de repetição B (760pb, *primer* O3 - 5'-AGCCACTTAAGGCAAT-3' e O4 - 5'-AGTTGATGTGTTAGA-3'). As reações de PCR foram preparadas em uniplex, em volume final de 100µL, contendo 5U de taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2mM de dNTPs (Invitrogen®), tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl - Invitrogen®), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen®), *primers* nas concentrações de 0,5 µM cada e adição de 10µL de DNA mantido a 95°C por 10 minutos. As reações foram executadas em termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems®) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de amplificação consistindo de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 50°C e 90 segundos de extensão a 72°C, e 7 minutos de extensão final a 72°C. Os produtos da PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®), corados com brometo de etídio (Ludwig®) 0,6µg/mL e visualizados em transiluminador (Major Science®). A purificação dos produtos de PCR foi feita com a utilização de kit PureLink

Quick PCR Purification Kit (Invitrogen®) para purificação de produtos de PCR, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. O material genético foi quantificado através de fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen®) para sequenciamento em sequenciador ABI 3500xL (Applied Biosystems®).

5.11. Capacidade de formação de biofilme *in vitro*

A avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* seguiu a metodologia descrita por BORGES et al. (2018). Os isolados foram incubados em caldo BHI (Kasvi®) por 24 horas a 37°C, seguidos de cultivo em ágar Triple Soy Agar (TSA) (Kasvi®) nas mesmas condições de temperatura e tempo de incubação. Uma colônia isolada do ágar, na etapa anterior, foi inoculada em caldo TSB (Kasvi®) por aproximadamente 24 horas. As suspensões bacterianas foram preparadas para atingir a concentração 1 na escala MacFarland (Nefelobac - Probac®), sendo então adicionados 200µL da suspensão em cada poço de uma microplaca de poliestireno estéril (Olen®). Cada inóculo foi adicionado em 3 poços diferentes. Todas as placas continham controle negativo composto de caldo TSB sem inóculo. As placas foram então incubadas a 10°C, 24°C e 37°C, e procedeu-se com o preparo das microplacas para leitura após 24, 48 e 72 horas, consistindo em retirada do inóculo, três lavagens dos poços com solução salina 0,9%, fixação do biofilme com 200µL de metanol por 15 minutos e utilização de cristal violeta para corar os poços por 5 minutos, com posterior lavagem dos mesmos para retirada do corante. Após secagem em temperatura ambiente, procedeu-se com a ressuspensão do corante em 200µL de ácido acético glacial a 33% para a leitura da densidade óptica (DO) dos poços em leitor de microplaca Varioskan LUX

(ThermoFisher®) a 550nm de comprimento de onda. Todos os testes foram realizados em triplicata, e utilizou-se o valor da média das repetições para análise dos resultados.

A classificação dos isolados em formadores fortes, formadores moderados, formadores fracos e não formadores de biofilme foi feita de acordo com o protocolo descrito por STEPANOVIĆ et al. (2000). Para tal, utilizou-se os valores de DO do controle negativo (DOc) como parâmetro, sendo classificado de acordo com os seguintes valores:

$DO \leq DOc \rightarrow$ não formador

$DOc < DO \leq 2xDOc \rightarrow$ formador fraco

$DOc < DO \leq 4xDOc \rightarrow$ formador moderado

$DO > 4xDOc \rightarrow$ formador forte , onde:

DO: valor médio da densidade óptica do isolado

DOc: valor médio da densidade óptica do controle negativo

5.12. Análise estatística

Para análise descritiva dos dados, calculou-se a frequência absoluta e relativa das variáveis categóricas, que foram comparadas a partir das diferentes fontes de origem das estirpes analisadas. As variáveis contínuas foram avaliadas por meio de cálculos de média e variância para comparação entre as fontes analisadas (DANIEL, 2013). Essas análises foram realizadas no programa Microsoft Excel 365 (versão 2503, Microsoft Corporation®, 2025). Nos ensaios de capacidade de formação de biofilme e capacidade de adesão celular, foi calculada a média dos valores de cada repetição, com exclusão de

outliers pelo critério de 2,25 desvios padrão da média (AGUINIS; GOTTFREDSON; JOO, 2013). Para comparação da densidade de biofilme em função de tempo e temperatura, aplicou-se Modelo Linear de Efeitos Mistos (Mixed Model), estimado pelo método REML (*Restricted Maximum Likelihood Estimation*). O teste Type III ANOVA foi utilizado para verificar a significância dos efeitos fixos. Para comparação da capacidade de formação de biofilme e expressão de curli e celulose, aplicou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson, complementado pelos testes Razão de Verossimilhança e Mantel-Haenszel, e foi aplicado o Teste Exato de Fisher para garantir maior robustez na inferência estatística. A relação entre a capacidade de adesão celular e a capacidade de formação de biofilme foi avaliada por meio de Regressão Logística Binária, utilizando o método de otimização Fisher's Scoring, e a significância do efeito da variável de adesão celular foi determinada pelo Teste de Wald. Os testes estatísticos foram realizados no programa SAS (*Statistical Analysis System*®), com intervalo de confiança de 95%. Os resultados das análises estatísticas estão no Anexo I.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento e análise de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*

6.1.1. Análise dos isolados de *Escherichia coli*

Foram recuperados em cultivo e analisados os 31 isolados de *E. coli*, dos quais 5 foram oriundos de ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, 7 oriundos de ambientes de abatedouros-frigoríficos de bovinos, 9 oriundos de ambientes de abatedouros-frigoríficos de suínos, 8 isolados de carcaças de suínos e 2 oriundos de alimentos de origem animal, sendo um oriundo de linguiça suína e um oriundo de queijo

minas padrão. A presença de *E. coli* em ambientes de produção de alimentos de origem animal, tais como ambientes de abatedouros frigoríficos de espécies domésticas e alimentos de origem animal não é considerado novidade no país. Diversos estudos detectaram esse microrganismo a partir de amostras de alimentos de origem animal e nestes ambientes no Brasil, e em diferentes épocas (SANTOS et al., 2018; DE ASSIS et al., 2021; SAMPAIO et al., 2024). No Distrito Federal, poucos são os estudos de caracterização de *E. coli* oriundas de alimentos de origem animal e ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, suínos e bovinos (DOS SANTOS et al., 2022; COELHO et al., 2024). A legislação brasileira exige a pesquisa de *E. coli* em alimentos prontos para consumo e carnes bovina, suína e de aves, estabelecendo limites de contagem para cada categoria (BRASIL, 2022, 2024b). O controle microbiológico dentro de abatedouros-frigoríficos de suínos e bovinos exige a pesquisa de STEC em carnes bovinas, especialmente sorotipos O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 e O145 em razão de seu alto risco para a saúde pública (BRASIL, 2018).

A presença de *E.coli* em alimentos de origem animal, ambientes de produção destes alimentos e carcaças representa os desafios enfrentados pela indústria com relação à execução de boas práticas de produção. A detecção desse microrganismo em utensílios utilizados no abate e processamento de carnes de bovinos, suínos e aves, assim como a detecção em instalações como paredes, pisos e ralos desses ambientes, representa um potencial risco à saúde pública em função da facilidade de contaminação cruzada decorrente do contato desses microrganismos com os alimentos produzidos. Estudos mostram a capacidade de disseminação desse microrganismo em ambientes de produção de alimentos de origem animal, levando a potenciais riscos de contaminação dos alimentos (AMÉZQUITA-MONTES et al., 2015; HONISH et al., 2017; ESSENDUBI et al., 2020; GUO et al., 2024). Com o objetivo de mitigar os riscos associados à presença

desse microrganismo em alimentos de origem animal e ambientes de produção de alimentos de origem animal, torna-se necessária a vigilância e a instituição de mecanismos de controle desses riscos nestes ambientes e alimentos. Desta forma, a legislação brasileira estabelece mecanismos de autocontrole a serem instituídos nos abatedouros-frigoríficos de bovinos e suínos, com o controle microbiológico em carcaças dessas espécies como meio de avaliação da higiene do processo e redução da incidência desses potenciais patógenos, através da Instrução Normativa SDA/MAPA 60/2018 (BRASIL, 2018), bem como normativas que estabelecem Procedimentos Operacionais Patronizados relacionados às Boas Práticas de Fabricação que contribuem para a garantia das condições higiênico-sanitárias adequadas em ambientes de produção e industrialização de alimentos (BRASIL, 2002), além do estabelecimento de limites máximos nos padrões microbiológicos deste microrganismo a serem analisados em amostras de alimentos para que sejam considerados seguros para o consumo humano (BRASIL, 2022, 2024b).

6.1.2. Análise do isolado de *Listeria monocytogenes*

Foi recuperado e analisado com sucesso um (01) isolado de *L. monocytogenes* pertencente à bacterioteca do LAMAL, oriundo de carne cozida de frango pronta para consumo. Não foram detectados isolados de *L. monocytogenes* nas 26 amostras de alimentos analisadas no presente estudo.

Pesquisas mostram a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos de origem animal obtidas em diferentes regiões do Brasil, inclusive no Distrito Federal (MEDEIROS et al., 2021; CAVALCANTI et al., 2022). A legislação brasileira estabelece procedimentos para controle de *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal pronto

para consumo (BRASIL, 2009a). A legislação atual permite até 10^2 UFC/25g/mL de amostras de alimentos prontos para consumo, desde que não sejam destinados à lactentes ou fins especiais (BRASIL 2022). A legislação brasileira é semelhante à legislação europeia, que também permite até 10^2 UFC/g para alimentos prontos para consumo que não sejam destinados a lactentes ou fins especiais. A legislação estadunidense, por sua vez, determina ausência desse microrganismo em todos os alimentos (ESTADOS UNIDOS, 2025). Não há consenso sobre quais limites devem ser estabelecidos para a *L. monocytogenes*, uma vez que há necessidade de maiores esclarecimentos sobre a relação dose-resposta para desenvolvimento de doença relacionada a esse patógeno (SCHLECH, 2019; WHO, 2022b).

A legislação brasileira exige o estabelecimento de programas de autocontrole que envolvem avaliação da conformidade dos resultados dos procedimentos de controle, incluindo medidas preventivas, corretivas e de testes microbiológicos, exigindo controle da matéria-prima e higienização e sanitização durante o processo de produção com enfoque em *L. monocytogenes* (BRASIL, 2009a). Desse modo, a ausência de detecção de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas no presente estudo pode se relacionar ao baixo número de amostras analisadas, tendo em vista não ser o objetivo principal deste estudo, e também pode estar relacionado com boas práticas das indústrias de produção de alimentos de origem animal na região avaliada, seguindo as exigências da legislação brasileira, as quais têm sido implementadas desde 2009 pelos órgãos de inspeções oficiais.

6.2. Detecção de marcadores de virulência em isolados de *Escherichia coli*

Nas 31 estirpes de *E. coli* analisadas no presente estudo, foram detectados 08 dos 16 genes pesquisados relacionados à virulência do microrganismo. Em 20 dos 31 isolados foi detectado o gene *stx-1* (64,52%), em 13 dos 31 isolados detectou-se o gene *saa* (41,93%), em 11 dos 31 isolados detectou-se o gene *hlyA* (35,48%), em 08 dos 31 isolados foi detectado o gene *stx-2* (25,8%), em 04 dos 31 isolados detectou-se o gene *eae* (12,9%), em 02 dos 31 isolados detectou-se o gene *tir α* (6,45%), em 02 dos 31 isolados detectou-se o gene *tir β* (6,45%) e em 02 dos 31 isolados detectou-se o gene *tir γ* (6,45%). Os genes *stx-2c*, *stx-2d*, *espP*, *O111*, *O113* e *O157* não foram detectados em nenhum dos isolados testados no presente estudo. Apenas 01 isolado (134EC) não apresentou nenhum dos genes de virulência pesquisados. Os resultados da pesquisa dos genes de virulência dos 31 isolados de *E. coli* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Resultados da pesquisa de marcadores de virulência presentes nos 31 isolados de *Escherichia coli* oriundos de diferentes ambientes de produção de alimentos de origem animal e alimentos de origem animal.

Identificação dos isolados	Origem	Genes de virulência detectados
3EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa stx-1</i>
5EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa stx-1</i>
16EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa</i>
17EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>stx-1</i>
138EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa Tir β</i>
139EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa Tir γ</i>
140EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	<i>saa stx-2</i>
33EC	Ambiente de abatedouro de aves	<i>saa stx-1</i>
36EC	Ambiente de abatedouro de aves	<i>saa stx-1</i>
37EC	Ambiente de abatedouro de aves	<i>eae saa tir β</i>
39EC	Ambiente de abatedouro de aves	<i>hlyA saa stx-1</i>
50EC	Ambiente de abatedouro de aves	<i>stx-1</i>
67EC	Carcaça de suínos	<i>eae hlyA stx-1 stx-2</i>
68EC	Carcaça de suínos	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>
74EC	Carcaça de suínos	<i>stx-1</i>
75EC	Carcaça de suínos	<i>hlyA stx-1 tir α</i>
83EC	Carcaça de suínos	<i>eae hlyA saa stx-1 stx-2</i>

86EC	Carcaça de suínos	<i>hlyA stx-2</i>
88EC	Carcaça de suínos	<i>hlyA stx-2</i>
91EC	Carcaça de suínos	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>
115EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>hlyA stx-1</i>
116EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>eae hlyA</i>
117EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>saa stx-1</i>
119EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>tir α</i>
122EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>saa Tir γ</i>
125EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>stx-1</i>
130EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>stx-1</i>
131EC	Ambiente de abatedouro de suínos	<i>stx-1</i>
134EC	Ambiente de abatedouro de suínos	-
136EC	Queijo minas padrão	<i>stx-1</i>
137EC	Linguiça suína	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>

Foram classificados como STEC 23 dos 31 isolados de *E. coli* em função da presença dos genes *stx-1* e/ou *stx-2*. O gene *stx-1* foi detectado em ao menos uma estirpe de cada origem analisada no presente estudo, enquanto o gene *stx-2* não foi detectado em amostras de ambiente de abatedouros de aves e de suínos. Apenas 01 dos 07 isolados oriundos de ambiente de abatedouros frigoríficos de bovinos apresentou o gene *stx-2*. Os genes *stx-1* ou *stx-2* foram detectados em 04 dos 07 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos. Ruminantes são importantes reservatórios de STEC, funcionando como fontes de contaminação cruzada dos alimentos na etapa de abate de bovinos (NASTASIJEVIĆ; MITROVIĆ; JANKOVIĆ, 2014). Fatores relacionados ao pré-abate e abate desses animais podem influenciar na ocorrência de STEC, como o tempo de espera para abate, em que situações de estresse dos animais podem favorecer a proliferação do microrganismo, e minimização da contaminação do ambiente de produção de alimento, através da aplicação de planos de controle de higiene e sanitização das instalações (CALLAWAY et al., 2013; NASTASIJEVIĆ; MITROVIĆ; JANKOVIĆ, 2014). A detecção desses genes em isolados oriundos de ambientes de abatedouros-

frigoríficos de bovinos, em especial o gene *stx-2* por sua associação a quadros mais graves em humanos, é importante para fornecer dados sobre a segurança dos alimentos produzidos e permitir a mitigação dos riscos para a população com a implementação e adaptação de planos de controle dentro da indústria de produção de alimentos de origem animal. Diversos estudos detectaram a presença de genes relacionados à produção de shiga-toxina nas diversas regiões do país, e oriundos de diferentes fontes (animais, alimentos e humanos) (CASTRO et al., 2019). A detecção de isolados de *E. coli* carregando esses genes a partir de fontes distintas descrita no presente estudo é importante para a vigilância e proteção da saúde da população, uma vez que, apesar de sua detecção não indicar a patogenicidade da estirpe em questão, é ainda assim uma importante ferramenta de vigilância para a avaliação da circulação de STEC na região avaliada.

Foi detectado o gene *eae* em 04 dos 31 isolados de *E. coli* analisados. Em 02 desses 04 isolados (37EC e 116EC), o gene *eae* não estava associado com a presença dos genes *stx-1* ou *stx-2*, sendo esses isolados classificados como EPEC (DENAMUR et al., 2021). Esse gene é comumente detectado em uma ilha de patogenicidade associada a estirpes altamente virulentas denominada *locus* de apagamento de enterócitos (*locus for enterocyte effacement* – LEE), sendo frequentemente utilizado como indicador da presença de LEE (PATON; PATON, 2002), e sua detecção em isolados STEC oriundos de carcaças e ambientes de produção de alimentos indica potencial risco para a saúde da população consumidora. Dentre os 04 isolados que apresentaram o gene *eae*, 02 deles possuíam os genes *stx-1* e *stx-2* (isolados 67EC e 83EC), sendo esses dois classificados como pertencentes ao grupo EHEC (TOMA et al., 2003; DE MELO TAVARES et al., 2024), ambos oriundos de carcaças de suínos. A presença de isolados que possuem esses dois genes relacionados a isolados EHEC diretamente em carcaças suínas pode representar um potencial risco à saúde dos consumidores, uma vez que se trata de patotipo

relacionado a afecções graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). Estudos mostraram associação em especial de *stx-2* e *eae* como indicadores de isolados fortemente relacionados a doença em humanos, sugerindo uma ação sinérgica entre os dois genes (BOERLIN et al., 1999), e indicando a importância da pesquisa da presença desses genes, especialmente quando presentes no mesmo isolado, para fornecimento de dados epidemiológicos para tomadas de decisão relacionadas à saúde pública.

A presença do gene *hlyA* foi detectada em isolados oriundos de carcaças de suínos (em 07 dos 08 isolados), em ambientes de abatedouros de suínos (02 dos 08 isolados), alimento de origem animal (linguiça suína) e ambiente de abatedouro de aves (01 dos 05 isolados). O gene *hlyA*, responsável pela codificação da hemolisina A, é um fator de virulência comumente detectado em isolados relacionados a estirpes patogênicas extra-intestinais de *E. coli* (exPEC), potencialmente causadoras de meningite, pneumonia e infecções do trato urinário (MENCK-COSTA et al., 2023). Sua detecção em carcaças suínas e alimento de origem animal é de especial importância, considerando a potencial exposição do consumidor a esse microrganismo.

O gene *saa*, responsável pela codificação de uma proteína de membrana com propriedades de adesina aglutinativa (PATON et al., 2001), foi detectado em 13 dos 31 isolados de *E. coli* analisados, estando associado a amostras de ambientes em 12 dos 13 isolados. A presença de Saa está associada à maior capacidade de adesão celular, contribuindo com a patogênese em humanos, tendo sido descrita inicialmente a partir de amostras patogênicas de STEC (PATON et al., 2001). Em 02 dos 04 isolados que apresentaram o gene *saa*, houve também a detecção do gene *eae* (37EC e 83EC). Esse achado difere de outros estudos, onde os isolados comumente não possuem os dois genes associados (PATON et al., 2001; ALONSO et al., 2017; LEE et al., 2017). O resultado apresentado no presente estudo, porém, corrobora com os resultados apresentados por

FREITAS FILHO e colaboradores (2014), que detectaram a presença concomitante dos genes *eae* e *saa* em dois isolados O157:H7 oriundos de bovinos leiteiros na região Centro-oeste do Brasil. A presença de ambos os genes em um mesmo isolado pode indicar um maior potencial patogênico dos mesmos e demonstra a capacidade de disseminação de genes de virulência entre isolados de *E. coli* através dos mecanismos de transferência genética horizontal, o que pode fazer com que esses isolados funcionem como reservatórios de genes de virulência dentro da cadeia de produção de alimentos de origem animal.

Foram detectados genes relacionados ao receptor de intimina (*tir-α*, *tir-β* e *tir-γ*) em 04 dos 31 isolados analisados no presente estudo. Todos foram detectados em amostras oriundas de ambientes de abatedouros frigoríficos, sendo 02 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos (138EC e 139EC), 01 isolado oriundo de abatedouro de aves (37EC) e 01 isolado oriundo de abatedouro de suínos (122EC). O receptor de intimina translocado (*tir*) é a primeira proteína efetora translocada para dentro da célula hospedeira após a ação do sistema de secreção do tipo III, permitindo o desenvolvimento das lesões A/E características de EPEC. O isolado EPEC 37EC foi um dos isolados nos quais foi detectado o gene *tir-β*, o que indica um potencial patogênico do isolado em questão. Os outros 03 isolados que apresentaram os genes relacionados à *tir* não foram classificados como EPEC. Mesmo assim, sua presença em isolados oriundos de fontes de ambientes de abatedouros-frigoríficos indicam a circulação do gene que, através dos mecanismos de transmissão horizontal de genes, pode ser disseminado para isolados que podem passar a apresentar riscos para a saúde da população.

Não foram detectados os genes *O111*, *O113* e *O157*, relacionados a alguns dos principais sorotipos predominantes de STEC em casos de doenças em humanos (DENAMUR et al., 2021). Estima-se que exista mais de 470 sorotipos capazes de

produzir shiga-toxina, e mais de 100 sorotipos podem ser capazes de levar a quadros de doenças em humanos (WHO, 2018). Considerando essa variabilidade decorrente da ampla capacidade de transferência horizontal de genes entre esses microrganismos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) concluiu que, apesar de útil para fornecer dados epidemiológicos relacionados à investigação de surtos e vigilância em prevalência de sorotipos, a detecção de sorotipos específicos não pode ser utilizada para prever o perfil de virulência de cepas (WHO, 2018), sendo mais importante a detecção de fatores de virulência relacionados a produção de stx e fatores de aderência (genes *stx*, *eae*, *saa*) (WHO, 2018). Desse modo, a detecção de isolados STEC no presente estudo apresenta um potencial risco para a população, mesmo que não tenham sido detectados genes relacionados aos sorotipos pesquisados.

6.3. Detecção de genótipos por RAPD dos isolados de *Escherichia coli*

Foram detectados 29 padrões RAPD distintos na análise de variabilidade genética dos 31 isolados de *E. coli* realizada através do PCR RAPD com a utilização do primer M13, divididos em 07 *clusters*, contendo entre 03 e 06 isolados cada. Todos os isolados foram submetidos à PCR em pelo menos 03 experimentos independentes para confirmação dos padrões detectados. O resultado do dendrograma construído pelo método UPGMA para os 31 isolados de *E. coli* está apresentado na Figura 2. Foram considerados clones os isolados cujo índice de homologia foi de pelo menos 95% (NDEGWA et al., 2022). Os padrões RAPD detectados neste estudo apresentaram entre 02 e 09 bandas, com pesos moleculares entre 350 e 2100 pares de base (pb). O *cluster* I apresentou 90% de homologia, com 03 isolados oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves e de suínos, sendo que os 02 isolados oriundos de abatedouros de

suínos foram considerados clones (125EC e 130EC). O *cluster* II agregou isolados oriundos de carcaça de suínos (01 isolado), ambientes de abatedouros de suínos (03 isolados) e ambiente de abatedouro de bovinos (01 isolado). O *cluster* III apresentou isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves (02 isolados) e ambientes de abatedouros de bovinos (04 isolados). O *cluster* 04 agregou 04 isolados oriundos de carcaças de suínos, dentre os quais 02 (88EC e 91EC) apresentaram 100% de homologia, sendo o único *cluster* que apresentou isolados oriundos da mesma origem. O *cluster* V apresentou 04 isolados oriundos de ambiente de abatedouro de suínos, alimento de origem animal (queijo minas tipo padrão), ambiente de abatedouro de aves e ambiente de abatedouro de bovinos. O *cluster* VI apresentou 04 isolados, oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, ambientes de abatedouros de aves, carcaça de suínos e ambiente de abatedouro de bovinos. Por fim, o *cluster* VII apresentou 05 isolados, oriundos de alimento de origem animal (linguiça suína), carcaça de suínos (02 isolados) e ambientes de abatedouros de suínos (02 isolados) (Figura 2).

Os isolados do *cluster* I 125EC e 130EC, que apresentaram 100% de homologia, foram oriundos de um mesmo abatedouro-frigorífico de suínos localizado no Distrito Federal. O isolado 125EC foi obtido a partir de amostra oriunda de *swab* oriundo de amostra de faca de sangria, enquanto o isolado 130EC foi oriundo de amostra coletada a partir de *swab* de parede da área suja (Quadro 1). A detecção de um mesmo padrão RAPD em amostras oriundas de diferentes pontos dentro do abatedouro de suínos analisado sugere disseminação dessa mesma cepa dentro do abatedouro-frigorífico em questão, o que pode representar falhas nas práticas de higienização, apesar dos mesmos se encontrarem na mesma área suja. Os isolados 88EC e 91EC, por sua vez, foram oriundos de duas partes diferentes coletadas na mesma carcaça suína, sugerindo uma fonte de contaminação comum. O padrão de genes de virulência detectados nos isolados homólo-

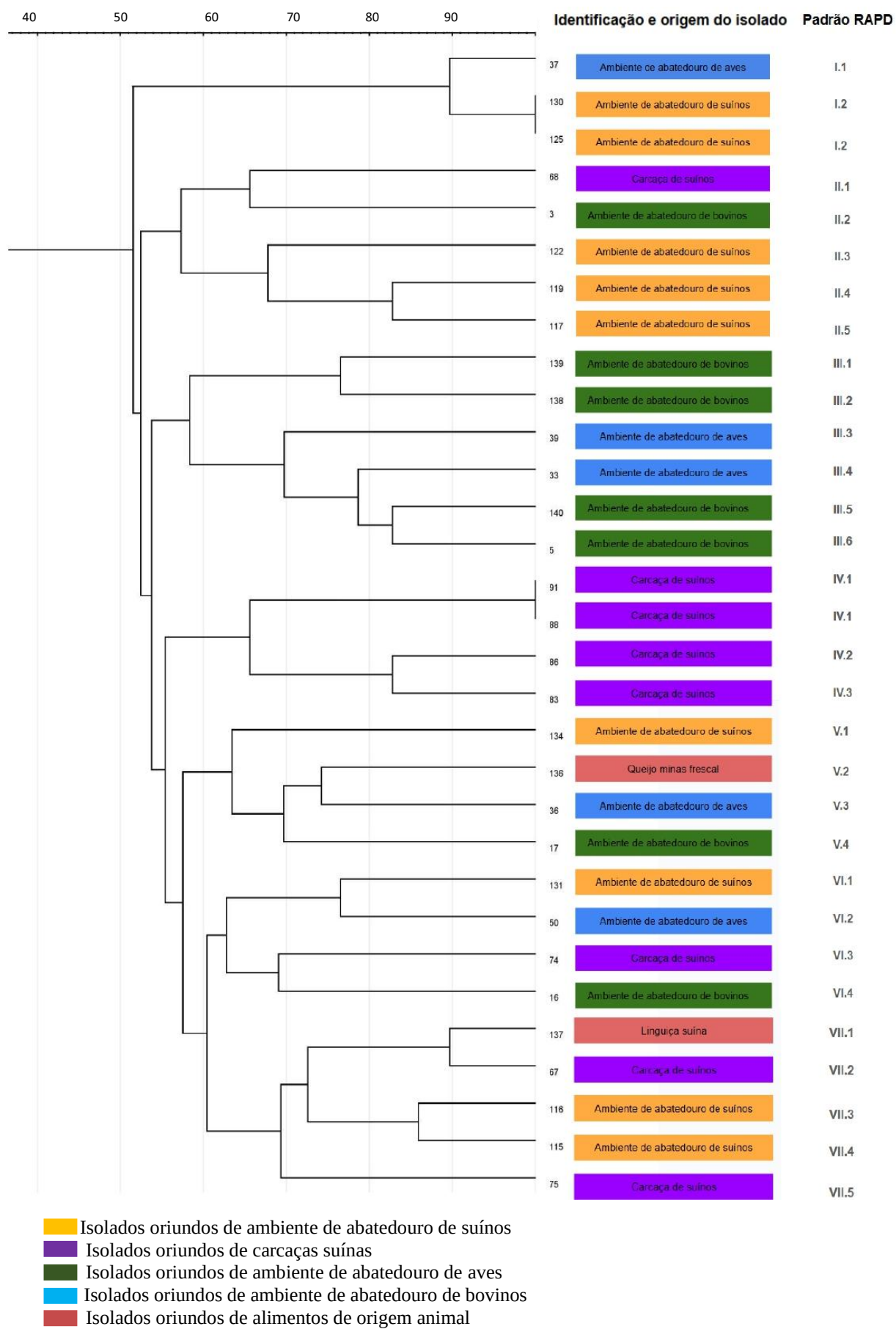


Figura 2- Dendrograma construído pelo método UPGMA com coeficiente de DICE a 1,5% dos padrões RAPD dos 31 isolados de *Escherichia coli* analisados.

-gos 125EC e 130EC foi o mesmo (gene *stx-1*, Tabela 1). Para os isolados 88EC e 91EC, o padrão foi o mesmo para dois genes detectados (*stx-2* e *hlyA*), mas o isolado 91EC apresentou também o gene *stx-1*, evidenciando a ocorrência de transferências genéticas entre os microrganismos presentes no ambiente analisado, levando estirpes a adquirir diferentes marcadores de virulência, potencialmente aumentando os riscos à saúde pública.

O RAPD é uma metodologia baseada na PCR amplamente utilizada e consolidada na literatura, que possui como pontos positivos sua reprodutibilidade, menor custo e facilidade de execução quando comparada com técnicas mais sensíveis, porém menos acessíveis em termos de custos, estrutura, tempo e dificuldade de execução técnica como a Eletroforese de Gel em Campo Pulsado (PFGE) ou o Sequenciamento de Genoma Completo (WGS) (ROSSETTI; GIRAFFA, 2005; MARIALOUIS; SANTHANAM, 2016; NDEGWA et al., 2022; STEFAŃSKA et al., 2022), mostrando-se uma ferramenta alternativa na busca de resultados relacionados à origem de contaminações ou disseminação de patótipos em alimentos e principalmente em ambientes de produção de alimentos de origem animal. Os resultados do RAPD apresentados mostram uma ampla variabilidade genética de *E. coli* nas fontes analisadas. Com exceção do *cluster* IV, no qual todos os isolados foram oriundos de carcaça suína, com um índice de similaridade de aproximadamente 65% entre si, todos os outros *clusteres* apresentaram isolados oriundos de diferentes origens. Os *clusteres* V e VI, especialmente, agregaram isolados oriundos de 04 das 05 fontes analisadas no presente estudo, indicando a disseminação de genótipos variados na região de obtenção dos isolados analisados. O *cluster* VII caracterizou-se por agregar isolados de fontes relacionadas a ambientes e alimentos associados à produção de carne suína, com índice de similaridade de quase 70% entre si,

indicando a disseminação de isolados filogeneticamente semelhantes na cadeia de produção de carne suína.

Não foram observados padrões de similaridade relacionados à presença de genes de virulência analisados no presente estudo. Todos os *clusters* continham isolados STEC. Os isolados EPEC 37EC e 116EC foram agregados nos *clusters* I e VII respectivamente, e os isolados EHEC 83EC e 67EC foram agregados nos *clusters* IV e VII respectivamente, indicando a alta variabilidade genética observada nos isolados analisados.

A técnica de genotipagem através do RAPD utilizada mostrou-se eficaz na avaliação da variabilidade e similaridade genéticas objetivadas no presente estudo, permitindo a determinação de padrões RAPD a partir do uso da sonda M13 em todos os 31 isolados de *E. coli*. Esses resultados demonstraram que há grande variabilidade genética entre isolados de *E. coli* oriundos de ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, bovinos e suínos, de carcaças suínas e de alimentos de origem animal presentes na região do Distrito Federal e Entorno. Os resultados também sugerem a disseminação de um mesmo padrão RAPD dentro de um abatedouro-frigorífico suíno, com a detecção do mesmo padrão RAPD em isolados oriundos de faca de sangria e parede de área suja. Esses resultados demonstram a variabilidade genética dos isolados de *E. coli* circulantes na região do Distrito Federal entre os anos de 2018 e 2023, e fornece dados para auxiliar as indústrias na determinação de possíveis pontos de contaminação dentro da cadeia de produção, permitindo tomadas de decisão que visem a mitigação dos riscos aos quais a população consumidora poderá estar exposta.

6.4. Detecção de sorotipos de *Listeria monocytogenes*

Foram detectados no isolado de *L. monocytogenes* os genes OFR 2819 e OFR2110, sendo o mesmo classificado como pertencente ao grupo III, 4b, 4d ou 4e (DOUMITH et al. 2004). Os resultados de detecção do sorotipo 4b, 4d ou 4e são similares com os resultados detectados por estudos que determinaram sorotipos de *L. monocytogenes* oriundos de outras fontes relacionadas à cadeia de produção de alimentos de origem animal, como a detecção de maior ocorrência do sorotipo 4 (4b, 4d ou 4e) em isolados oriundos de carne bovina no Mato Grosso descrita por TEIXEIRA et al. (2019), e a detecção de isolados pertencentes ao sorotipo 4b em fontes de diferentes pontos na cadeia de produção suína no Brasil descrita por SERENO et al. (2019). Na região do Distrito Federal, o resultado da detecção de isolado pertencente ao sorotipo 4 apresentado no presente estudo corrobora os achados de PALMA et al. (2016), que detectaram isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4b em amostras oriundas de carnes bovinas, e MEDEIROS et al. (2021), que detectaram isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4b em amostras oriundas de carnes bovinas e salsichas do tipo hot dog. A detecção dos sorotipos 4d e 4e é infrequente tanto em amostras de alimentos quanto em casos de listeriose humana (DOUMITH et al., 2004), e o sorotipo 4b é um dos sorotipos mais frequentemente associados à listeriose humana (PONTELLO et al., 2012; LOPES-LUZ et al., 2021). Por este motivo, a detecção de isolado de *L. monocytogenes* em alimento de origem animal potencialmente pertencente ao sorotipo 4b é importante para a saúde pública, uma vez que pode significar potencial risco para a população, ao entrar em contato com microrganismos pertencentes a esse sorotipo.

6.5. Antibiógrama, detecção de genes de resistência antimicrobiana e produção de β -lactamases de Amplo Espectro dos isolados de *Escherichia coli*

Foi detectada resistência antimicrobiana (RA) fenotípica a pelo menos uma de 13 bases farmacológicas antimicrobianas testadas em 29 dos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo. Foi observada resistência a todos os 13 antimicrobianos testados em pelo menos um dos 31 isolados analisados. A maior porcentagem de resistência detectada foi em relação à ampicilina, com 74,19% (23/31) dos isolados apresentando resistência à esta base. Para os outros antimicrobianos, foram detectados 22 isolados resistentes às sulfonamidas (70,97%), 21 isolados resistentes à amoxicilina (67,74%), 20 isolados resistentes à estreptomicina (64,52%), 17 isolados resistentes ao ácido nalidíxico (54,84%), 16 isolados resistentes à tetraciclina (51,61%), 15 isolados resistentes à cefazolina (48,39%), 15 isolados resistentes à doxiciclina (48,39%), 12 isolados resistentes ao ciprofloxacino (38,71%), 07 isolados resistentes à cefalexina (22,58%), 07 isolados resistentes à gentamicina (22,58%) e 03 isolados resistentes à ceftazidima (9,68%). Os resultados dos antibiogramas para cada isolado de *E. coli* encontram-se na Tabela 2.

Com relação à pesquisa dos genes relacionados à RA, foram detectados 13 dos 18 genes pesquisados nos 31 isolados de *E. coli*. O gene mais comumente detectado foi o *ampC*, que estava presente em 18 dos 31 isolados (58,06%), seguido pelo gene *tet(A)*, presente em 11 dos 31 isolados (35,48%), o gene *mcr-4* em 10 isolados (32,26%), *tet(B)* em 07 isolados (22,58%), *erm(B)* em 05 isolados (16,13%), *tet(M)* em 03 isolados (9,68%), *cmlA* em 03 isolados (9,68%), *sulI* em 03 isolados (9,68%), *mcr-3* em 02 isolados (6,45%), *tet(C)* em 02 isolados (6,45%), *cat1* em 01 isolado (3,23%), *blaSHV* em 01 isolado (3,23%) e *aac(3)-1* em 01 isolado (3,23%). Os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *ermA*, *ermC*, e *ereA* não foram detectados em nenhum dos 31 isolados de *E. coli* analisados neste estudo. Os genes detectados em cada isolado estão descritos na Tabela 2.

A detecção fenotípica de produção de β -lactamases de Amplo Espectro (ESBL) por disco aproximação foi observada em 11 (35,48%) dos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo. A produção de ESBL foi detectada em 05 dos 07 isolados oriundos de ambiente de abatedouros de bovinos, em 02 dos 05 isolados oriundos de ambiente de abatedouros de aves, em 02 dos 08 isolados oriundos de carcaças suínas e 02 dos 09 isolados oriundos de ambiente de abatedouros de suínos. Não foi detectado fenótipo de produção de ESBL em nenhum dos 02 isolados oriundos de alimentos de origem animal. Os resultados de detecção fenotípica de ESBL dos 31 isolados de *E. coli* encontram-se descritos na Tabela 2.

Com relação à detecção fenotípica de ampC plasmidial induzida por disco aproximação, nenhum dos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo apresentou fenótipo de produção dessas enzimas.

Foi detectada multirresistência antimicrobiana (MRA) em 26 dos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo (83,87%). Em 03 dos 07 isolados oriundos de ambiente de abatedouro de bovinos foi detectada MRA, e em 01 dos 02 isolados oriundos de alimentos de origem animal foi detectada MRA. Todos os 05 isolados oriundos de ambiente de abatedouro de aves apresentaram MRA, assim como todos os 08 isolados oriundos de carcaça suína e os 09 isolados oriundos de ambiente de abatedouros suínos. Os resultados de detecção de MRA nos 31 isolados de *E. coli* encontram-se descritos na Tabela 2.

Os resultados observados neste estudo de presença de RA em isolados de *E. coli* oriundos de alimentos e ambientes de produção de alimentos de origem animal estão de acordo com pesquisas que detectaram RA em isolados oriundos de origens semelhantes

Tabela 2- Resultados do antibiograma por teste de difusão em disco, pesquisa de genes de resistência antimicrobiana, detecção de produção de ESBL e detecção de isolados multirresistentes dos 31 isolados de *Escherichia coli*.

Identificação do isolado	Origem	Fenótipo de resistência antimicrobiana			Genes de Resistência antimicrobiana	Produção de ESBLs	Multirresistência
		R	I	S			
3EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	SUL NAL CFE CFZ CAZ AMP EST CIP	-	GEN SUL CLO DOX TET	<i>mcr-4 sulI</i>	-	+
5EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	SUL	AMO AMP	NAL CFE CFZ GEN CAZ EST CLO CIP DOX TET	<i>mcr-4 ampC</i>	*	-
16EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	AMO CFE CFZ SUL CAZ AMP CIP	GEN EST	NAL CLO DOX TET	<i>sulI tet(B) ampC</i>	*	+
17EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	AMO CFZ SUL AMP EST	NAL GEN CAZ	CFE CLO CIP DOX TET	<i>tet(B)</i>	*	+
138EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	CFZ	AMO AMP EST	NAL CFE CAZ CIP CLO DOX GEN SUL TET	<i>mcr-3 mcr-4 tet(C) ermB ampC</i>	*	-
139EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	-	NAL CFZ CAZ EST	AMO AMP CFE CIP CLO DOX GEN SUL TET	<i>mcr-4 tet(A) tet(B) ampC</i>	-	-

140EC	Ambiente de abatedouros de bovinos	SUL	CIP EST	NAL AMO AMP CFE CFZ CAZ CLO DOX GEN TET	<i>mcr-4 tet(A) ermB ampC</i>	-	-
33EC	Ambiente de abatedouro de aves	NAL CFZ SUL AMP CIP	AMO CAZ GEN EST	CFE CLO DOX TET	<i>ampC</i>	*	+
36EC	Ambiente de abatedouro de aves	AMO CFE CFZ SUL AMP	GEN CAZ EST	NAL CLO CIP DOX TET	<i>ampC</i>	-	+
37EC	Ambiente de abatedouro de aves	AMO NAL GEN SUL EST CIP	CAZ AMP	CFE CFZ CLO DOX TET	<i>ampC</i>	-	+
39EC	Ambiente de abatedouro de aves	AMO CFE CFZ GEN SUL AMP EST	CAZ CIP	NAL CLO DOX TET	<i>tet(A)</i>	-	+
50EC	Ambiente de abatedouro de aves	AMO NAL CFE CFZ SUL AMP CIP DOX TET	GEN CAZ EST	CLO	<i>cmlA ampC</i>	*	+
67EC	Carcaça de suínos	NAL AMO AMP CIP CLO EST GEN SUL	CFZ	CAZ CFE DOX TET	<i>mcr-4 tet(A) ermB ampC</i>	-	+
68EC	Carcaça de suínos	AMO AMP CLO DOX EST SUL TET	NAL CIP	CFE CFZ CAZ GEN	<i>Tet(M) ermB cmlA blaSHV ampC</i>	*	+
74EC	Carcaça de suínos	NAL AMO AMP CLO DOX EST SUL TET	-	CFZ CAZ CFE CIP GEN	-	-	+
75EC	Carcaça de suínos	NAL CIP CLO DOX EST GEN SUL TET	-	AMO AMP CFE CFZ CAZ	<i>ermB ampC</i>	-	+

83EC	Carcaça de suínos	AMO AMP CFZ CAZ CLO DOX EST TET	NAL CIP	CFE GEN SUL	<i>mcr-4 tet(C) tet(M) ampC</i>	*	+
86EC	Carcaça de suínos	NAL AMO AMP CIP CLO DOX EST SUL TET	CFZ	CAZ CFE GEN	<i>mcr-4 tet(M) ampC aac(3)-1</i>	-	+
88EC	Carcaça de suínos	NAL AMO AMP CLO DOX EST SUL TET	-	CFZ CAZ CFE CIP GEN	-	-	+
91EC	Carcaça de suínos	NAL AMO AMP CLO DOX EST SUL TET	-	CFE CFZ CAZ CIP GEN	<i>ampC</i>	-	+
115EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CFZ CLO EST TET	-	CAZ CFE CIP DOX GEN SUL	<i>ampC tet(A) sulI</i>	-	+
116EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CFE CLO DOX EST TET SUL	CFZ	CAZ CIP GEN	-	-	+
117EC	Ambiente de abatedouros de suínos	AMO AMP CFZ CLO DOX TET SUL	EST NAL	CAZ CIP CFE GEN	<i>tet(A) tet(B) cmlA</i>	*	+
119EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CAZ CFE	<i>mcr-3 tet(A) tet(B)</i>	*	+
122EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CAZ CFE	<i>tet(A) tet(B)</i>	-	+

125EC	Ambiente de abatedouros de suínos	CLO EST TET	DOX	NAL AMO AMP CAZ CFE CFZ CIP GEN SUL	<i>Tet(A)</i>	-	+
130EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CLO DOX	CIP EST	CFE CFZ CAZ GEN TET SUL	<i>Tet(A)</i>	-	+
131EC	Ambiente de abatedouros de suínos	AMP CFE CFZ CLO EST	-	NAL AMO CAZ CIP DOX GEN TET SUL	<i>cat1</i>	-	+
134EC	Ambiente de abatedouros de suínos	NAL AMO AMP CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CFZ CAZ CFE	<i>ampC tet(B)</i>	-	+
136EC	Alimento de origem animal	-	CIP EST	NAL AMO AMP CFE CFZ CAZ CLO DOX GEN SUL TET	<i>mcr-4 tet(A) ampC</i>	-	-
137EC	Alimento de origem animal	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO DOX EST TET	SUL	CFE CAZ GEN	<i>mcr-4</i>	-	+

R = resistente; I = resistência intermediária; S = sensível

*- isolados produtores de ESBL

+ - isolados que apresentam multirresistência antimicrobiana

(LIMA et al., 2017; SAMPAIO et al., 2024). Neste estudo, a RA às quinolonas foi analisada por meio do ácido nalidíxico (NAL) e ciprofloxacino (CIP). Apenas 05 dos 31 isolados de *E. coli* não apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária a essa classe de antimicrobiano. Corroborando com os resultados observados neste estudo, SOUSA et al. (2024) detectaram em uma meta-análise a resistência ao ácido nalidíxico em aves como a mais prevalente a nível global. Verificou-se ainda no presente estudo que a resistência ou sensibilidade intermediária à esta classe de antimicrobianos está presente de forma disseminada nos diferentes ambientes analisados, o que por sua vez pode restringir o uso desses antimicrobianos como opções terapêuticas, afetando dessa maneira a saúde pública.

A resistência a tetraciclina não foi observada em nenhum dos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, e em apenas 01 dos 05 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves. O resultado de detecção em apenas 01 dos isolados oriundos de abatedouros de aves difere dos resultados descritos por SOUSA et al. (2024), que detectaram a resistência a tetraciclina como a segunda maior prevalência de resistência em isolados oriundos de aves a nível global. Nos isolados oriundos de alimentos de origem animal, foi detectada resistência fenotípica à tetraciclina em um dos dois isolados analisados (137EC). Com relação aos isolados oriundos de carcaças de suínos, apenas 01 dos 08 isolados analisados não apresentou resistência à tetraciclina e doxiciclina. De modo semelhante, apenas 01 dos 09 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos não apresentou resistência à tetraciclina ou à doxiciclina. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por SAMPAIO et al. (2024), que detectaram resistência à tetraciclina em 84,1% dos isolados de *E. coli* em amostras oriundas de etapas de processamento de carne suína. Os resultados de resistência à essa classe de antimicrobianos concentrados em amostras de ambientes e carcaças suínas

sugere uma disseminação desse tipo de resistência antimicrobiana em suínos, que pode estar associada ao uso terapêutico dessa classe de antimicrobianos nesses animais na região analisada, uma vez que a legislação brasileira apenas proíbe o uso de tetraciclina como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho e como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009b).

Apesar de não ter sido observada resistência fenotípica à tetraciclina ou à doxiciclina nos 07 isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos, foram detectados os genes *tet(A)* e/ou *tet(B)* em 05 desses isolados. De modo semelhante, houve a detecção do gene *tet(A)* em 01 dos 05 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, sem que houvesse a detecção de resistência fenotípica a esse antimicrobiano no isolado em questão. Nos isolados oriundos de carcaças de suínos, 04 dos isolados que apresentaram resistência à tetraciclina não apresentaram genes relacionados à resistência a esse antimicrobiano, e em 02 deles detectou-se resistência fenotípica à tetraciclina, mas não foram detectados os genes *tet(A)*, *tet(B)* ou *tet(M)*. Nos isolados oriundos de alimentos, apesar de não ter sido observada resistência às tetraciclina testadas, em um dos 02 isolados foi detectado o gene *tet(A)*. Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, apenas 01 dos 07 isolados resistentes à tetraciclina não apresentou nenhum dos genes relacionados pesquisados neste estudo, e 01 dos isolados que apresentaram resistência fenotípica a esse antimicrobiano não apresentou nenhum dos genes *tet* pesquisados. Os resultados onde se observou a resistência fenotípica sem a detecção concomitante de algum dos genes relacionados à resistência a tetraciclina pesquisados podem estar relacionados com a possível presença de outros genes responsáveis por conferir resistência a essa classe de antimicrobianos que não foram pesquisados nos isolados analisados no presente estudo, como os genes *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(K)* e *tet(X)* (AMINOV et al., 2002;

GROSSMAN, 2016), ou então com mutações no local de ligação ribossomal ou mutações cromossômicas que resultem em elevação de expressão de mecanismos intrínsecos de resistência como expressão de bombas de efluxo (GROSSMAN, 2016). Já os resultados de detecção de genes relacionados à resistência a essa classe de antimicrobianos, sem a observação fenotípica de resistência no teste de disco difusão, pode se relacionar a fatores de alterações na regulação da expressão gênica, mutações nos genes ou alterações nos processos de tradução, dos quais decorram alterações nas proteínas, resultando em diminuição ou perda de função. Os resultados de detecção fenotípica e de genes relacionados à resistência às tetraciclínas, especialmente em isolados oriundos de carcaças suínas e alimentos de origem animal, são importantes como indicadores da circulação de genes na cadeia de produção de alimentos, podendo representar assim um risco à saúde pública.

A resistência fenotípica ao cloranfenicol (CLO) foi observada em 100% dos isolados oriundos de ambientes de abatedouros suínos e de carcaças suínas, e também no isolado oriundo da linguiça suína. Esses resultados são similares aos observados em estudo que avaliou o perfil de RA de *E. coli* oriundas de fontes pertencentes à cadeia de produção de carne suína em São Paulo, cuja frequência de detecção foi de 78,3%, segundo SAMPAIO et al. (2024). O gene *cat1* foi detectado em 01 isolado resistente ao CLO oriundo de ambiente de abatedouro de suínos (131EC), e o gene *cmlA* foi detectado em 01 isolado resistente ao CLO oriundo de carcaça suína (68EC), 01 isolado resistente ao CLO oriundo de ambiente de abatedouro de suínos (117EC), e 01 isolado sensível ao CLO oriundo de ambiente de abatedouro de aves (50EC). Os resultados de detecção de resistência fenotípica ao CLO com ausência de detecção dos genes *cat1* ou *cmlA* podem estar relacionados à presença de outros genes relacionados à resistência aos anfenícois, ou genes que conferem resistência cruzada ao cloranfenicol, como o gene *floR*,

relacionado à resistência ao florfenicol (SCHWARZ et al., 2004). Nenhum dos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos e de aves apresentaram resistência ao cloranfenicol, e o isolado oriundo de língua suína também apresentou sensibilidade a esse antimicrobiano. Esses resultados sugerem uma menor circulação de genes relacionados à resistência ao CLO nessas cadeias de produção na região do Distrito Federal e Entorno.

Os resultados de sensibilidade ao CLO em todos os isolados oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves pode estar relacionado com a proibição do uso desse antimicrobiano em animais de produção pela legislação brasileira em 2003 (BRASIL, 2003). Em contraste, a circulação de resistência a esse antimicrobiano em elevadas taxas observada em isolados oriundos da cadeia de produção de carne suína indica a persistência da circulação de isolados resistentes a essa droga. O cloranfenicol é um antimicrobiano em desuso na medicina humana em função de seus efeitos colaterais de anemia aplástica e supressão medular, podendo ser observados mesmo em doses baixas (SCHWARZ et al., 2004). Por este motivo, o *Codex Alimentarius* sugere medidas para que se previna a presença desse antimicrobiano em alimentos com a proibição da utilização dessa droga em animais de produção (FAO/WHO, 2023). Na legislação brasileira, o CLO é listado como insumo farmacêutico ativo com limite máximo de resíduos não recomendado. O florfenicol, por sua vez, possui limites máximos de resíduos descritos para diferentes categorias de produtos de origem animal (BRASIL, 2019). É possível que a resistência ao cloranfenicol observada em isolados oriundos de fontes relacionadas à cadeia de produção de carne suína esteja relacionada com resistência cruzada ao florfenicol, que pode ser utilizado na produção animal. Um estudo utilizando transconjugação demonstrou a capacidade de perpetuação do gene *cmlA* a partir de sua presença em plasmídeos contendo genes associados à resistência a outros

antimicrobianos, como aminoglicosídeos e sulfonamidas, sugerindo que, mesmo na ausência de pressão de seleção diretamente relacionada ao uso do CLO, há a manutenção de gene de resistência a esse gene a partir da ligação do mesmo com outros genes relacionados à resistência a outros antimicrobianos (BISCHOFF et al., 2005). Porém, no presente estudo, poucos foram os isolados que apresentaram o gene *cmlA*, indicando que a alta ocorrência de isolados resistentes a esse antimicrobiano está provavelmente associado à resistência cruzada pelo uso do florfenicol. Apesar da mitigação dos riscos aos consumidores decorrente da proibição do uso do cloranfenicol em animais de produção, a detecção de resistência a esse antimicrobiano e a detecção de genes relacionados a essa resistência fornecem dados para a avaliação da eficácia dos protocolos instituídos pelas autoridades, e denota a necessidade de enfoque na cadeia de produção suína na região do Distrito federal e Entorno. É importante considerar o papel da *E. coli* dentro do ambiente de produção de alimentos de origem animal como um reservatório para genes de RA, contribuindo para a disseminação de microrganismos resistentes que representam riscos para a saúde pública.

A segunda RA mais frequentemente detectada nos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo foi a resistência às sulfonamidas (SUL), observada em 22 dos 31 isolados analisados. Todos os isolados oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, 05 dos 07 isolados apresentaram resistência à SUL, e com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, 05 dos 09 isolados apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Os isolados oriundos de carcaças suínas apresentaram resistência à SUL em 07 dos 08 isolados oriundos dessa fonte. Nenhum dos dois isolados oriundos de alimentos de origem animal apresentou resistência à SUL, mas um dos isolados apresentou sensibilidade

intermediária ao mesmo. Apesar da alta taxa de detecção de resistência à SUL nos isolados analisados, apenas 02 isolados resistentes a essa droga, oriundos de ambientes de abatedouros bovinos, apresentaram o gene *sul1* (3EC e 16EC). Em 01 isolado oriundo de abatedouro frigorífico de suínos foi detectado o gene *sul1* (115EC), porém esse isolado não apresentou o fenótipo de resistência. Esse resultado pode estar associado a mutações no gene ou alterações no mecanismo de tradução que inviabilizem a produção da enzima sul associada a esse gene. Com relação aos isolados que apresentaram resistência à SUL sem apresentar o gene *sul1*, outros genes associados à resistência às sulfonamidas que não foram pesquisados podem estar presentes, tais como *sul2*, *sul3* e *folP* (VENKATESAN et al., 2023). As sulfonamidas foram os primeiros componentes sintéticos a serem utilizados como antimicrobianos, e possuem ampla utilização na medicina humana e veterinária (VENKATESAN et al., 2023). Desse modo, os resultados de resistência a esse antimicrobiano observados no presente estudo representam uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a ocorrência de resistência a essa droga compromete sua utilização na terapêutica humana e animal.

A resistência fenotípica a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos foi avaliada a partir da análise de resistência à gentamicina (GEN) e à estreptomicina (EST). Não foi observada resistência à GEN nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, e apenas 02 isolados apresentaram sensibilidade intermediária a essa droga (16EC e 17EC). Também não foi observada resistência à GEN nos 02 isolados oriundos de alimentos de origem animal. Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, foi detectada resistência fenotípica à GEN em 02 isolados (37EC e 39EC), e sensibilidade intermediária nos outros 03 isolados. Nos isolados oriundos de carcaças suínas, foi detectada resistência a esse antimicrobiano em 02 dos 08 isolados (67EC e 75EC). Nos isolados oriundos de ambiente de abatedouros de suínos, foi detectada

resistência fenotípica em 03 dos 09 isolados (119EC, 122EC e 134EC). Com relação à EST, foi detectada resistência fenotípica em 02 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos (3EC e 17EC), e outros 04 isolados apresentaram sensibilidade intermediária a esse antimicrobiano (16EC, 138EC, 139EC e 140EC). Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, 02 isolados apresentaram resistência fenotípica à EST (37EC e 39EC) e os outros 03 isolados apresentaram sensibilidade intermediária a esse antimicrobiano. Com relação aos isolados oriundos de carcaças suínas, todos os isolados apresentaram resistência à EST. Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, 07 dos 09 isolados apresentaram resistência a esse antimicrobiano, e os outros 02 isolados apresentaram sensibilidade intermediária ao mesmo (117EC e 130EC). Com relação aos isolados oriundos de alimentos de origem animal, o isolado oriundo de amostra de linguiça suína (137EC) apresentou resistência à EST, enquanto o isolado oriundo de queijo minas tipo padrão apresentou sensibilidade a esse antimicrobiano.

Os resultados de ausência de resistência fenotípica à GEN e ocorrência de resistência fenotípica e sensibilidade intermediária à EST nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos corroboram com os verificados por SANTOS et al. (2018), que detectaram resistência e sensibilidade intermediária a EST em amostras oriundas de carcaças e carnes bovinas coletadas em abatedouro-frigorífico de bovinos na região Centro-Oeste do país, no Estado do Mato Grosso. Nenhum dos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves foi totalmente susceptível aos dois aminoglicosídeos testados, tendo todos os 05 isolados oriundos dessa fonte apresentado ao menos sensibilidade intermediária a pelo menos uma das suas bases de aminoglicosídeos testadas, e 02 dos 05 isolados de ambientes de abatedouros de aves apresentaram resistência à duas moléculas de aminoglicosídeos testadas (37EC e 39EC). Esses

resultados estão de acordo com os resultados apresentados por ROTH e colaboradores (2019), que verificaram em uma revisão de literatura taxas médias de resistência a GEN de 27% e a EST de 79% em *E. coli* no Brasil, demonstrando alta disseminação de resistência à essa classe de antimicrobianos na cadeia de produção de aves.

Os isolados oriundos de fontes relacionadas à ambientes de abatedouros de suínos e carcaças suínas foram os que apresentaram resistência a EST mais frequentemente, com todos os 08 isolados oriundos de carcaça suína sendo classificados como resistentes, e 07 dos 09 isolados oriundos de ambientes de abatedouros suínos apresentando resistência a esse antimicrobiano. Também foi detectada resistência à EST no isolado oriundo de amostra de linguiça suína (137EC). Esses resultados sugerem a ampla circulação de estirpes resistentes a esse antimicrobiano na cadeia de produção suína, o que pode estar relacionado ao uso dessa droga na cadeia de produção destes animais.

Com relação à GEN, apenas 02 dos 08 isolados oriundos de carcaças suínas e 03 dos 09 isolados oriundos de ambientes de abatedouros suínos apresentaram resistência a esse antimicrobiano. A detecção de resistência a GEN em *E. coli* oriundas de fontes relacionadas à cadeia de produção de carne suína foi descrita por outros autores em estudos realizados em outras regiões no Brasil (BRISOLA et al., 2019; SAMPAIO et al., 2024). O gene *aac(3)-I*, relacionado à resistência antimicrobiana à GEN, foi detectado em apenas 01 isolado, oriundo de carcaça de suíno (86EC). Porém, esse isolado não apresentou resistência fenotípica à GEN. Esse resultado pode estar relacionado a mutações no gene ou alterações nos mecanismos de expressão gênica dos quais decorram a não ativação ou a expressão de proteína não funcional, levando à não detecção fenotípica de resistência a esse antimicrobiano.

Aminoglicosídeos são antimicrobianos que tem sido utilizados novamente na clínica médica como opções de tratamento para infecções resistentes à β -lactâmicos e

fluoroquinolonas (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020). Os resultados descritos no presente estudo denotam a ocorrência de resistência a essa classe de antimicrobianos em isolados de *E. coli*, especialmente com relação à ocorrência de RA à EST em isolados oriundos de carcaças suínas, o que pode representar um risco à saúde pública em função do papel da *E. coli* como reservatório de genes de RA em ambientes de produção de alimentos de origem animal.

A avaliação da RA relacionada à colistina foi realizada através da pesquisa de genes relacionados à resistência a esse antimicrobiano. O gene relacionado à resistência à colistina mais comumente detectado foi o gene *mcr-4*, presente em 10 dos 31 isolados de *E. coli* analisados, dos quais 05 foram oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, 03 foram oriundos de carcaças suínas e 02 foram oriundos de alimentos de origem animal (Tabela 2). O gene *mcr-3* foi detectado em isolados oriundos de ambiente de abatedouro de bovinos (138EC) e ambiente de abatedouro de suínos (119EC). Os genes *mcr-1* e *mcr-2* não foram detectados em nenhum dos 31 isolados analisados. Os isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves não apresentaram nenhum dos genes relacionados à resistência a colistina pesquisados no presente estudo. A colistina é um antimicrobiano considerado como último recurso para tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes (CLSI, 2025). O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) não preconiza a detecção fenotípica de RA à colistina pelo uso do teste de disco aproximação, mas sim pelo método de inibição mínima (MIC). Apesar de não ter sido realizada a detecção fenotípica de resistência a esse antimicrobiano no presente estudo, a detecção de genes relacionados à resistência ao mesmo nas fontes analisadas, em especial em maior concentração nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos e nos isolados oriundos de alimentos prontos para consumo, denota a circulação desses genes nestes ambientes e alimentos de origem animal, servindo de reservatório e

potencialmente disseminador de resistência a essa importante droga de último recurso na terapêutica médica humana. A legislação brasileira proíbe a utilização da colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho desde 2016 (BRASIL, 2016), mas sua utilização terapêutica em animais de produção é permitida. Os resultados de detecção de genes de RA à colistina detectados no presente estudo podem indicar a necessidade de vigilância no uso de antimicrobianos na cadeia de produção de alimentos de origem animal, visando a proteção e a mitigação dos riscos à saúde pública.

O gene *ermB*, relacionado à RA à eritromicina, foi detectado em isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos (138EC e 140EC) e de carcaças de suínos (67EC, 68EC e 75EC). Não foi detectado nenhum dos outros genes relacionados à resistência a macrolídeos testados no presente estudo (*ermA*, *ermC* e *ereA*). Bactérias gram-negativas como *E. coli* são intrinsecamente resistentes aos macrolídeos em função da baixa permeabilidade de sua membrana externa a essa classe de antimicrobianos, impedindo sua entrada na célula bacteriana (MA et al., 2024). Porém, a detecção de genes relacionados à RA a macrolídeos como o *ermB* presente em 05 dos isolados analisados no presente estudo é importante em função do papel da *E. coli* como reservatório de genes de RA que, a partir de mecanismos de transferência horizontal de genes, pode levar à disseminação dos mesmos a outros microrganismos presentes nos ambientes analisados, levando à riscos para a saúde pública.

A RA para drogas da classe dos β -lactâmicos foi analisada a partir do teste de resistência em disco difusão de duas aminopenicilinas (amoxicilina (AMO) e ampicilina (AMP)), e por duas cefalosporinas de primeira geração (cefalexina (CFE) e cefazolina (CFZ)) e uma cefalosporina de terceira geração (ceftazidima (CAZ)). Com relação à AMO, foram detectados 02 isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos resistentes a esse antimicrobiano (16EC e 17EC), e 02 isolados apresentaram

sensibilidade intermediária (5EC e 138EC). Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, 04 dos 05 isolados apresentaram resistência a esse antimicrobiano, e 01 isolado apresentou sensibilidade intermediária ao mesmo (33EC). Nos isolados oriundos de carcaças de suínos, foi detectada resistência fenotípica à AMO em 07 dos 08 isolados (Tabela 2). Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, 07 dos 09 isolados apresentaram resistência fenotípica a esse antimicrobiano (Tabela 2). Nos isolados oriundos de alimentos de origem animal, foi observada resistência à AMO no isolado oriundo de amostra de língua suína (137EC). Com relação à AMP, 03 dos 07 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos apresentaram resistência fenotípica a esse antimicrobiano (3EC, 16EC e 17EC). Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, 04 dos 05 isolados apresentaram resistência à AMP, e 01 isolado (37EC) apresentou sensibilidade intermediária à mesma. Com relação aos isolados oriundos de carcaças suínas, os resultados foram os mesmos que os observados para AMO, com os mesmos 07 dos 08 isolados apresentando resistência fenotípica a esse antimicrobiano (Tabela 2). Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, 08 dos 09 isolados apresentaram resistência fenotípica à AMP (Tabela 2). Nos isolados oriundos de alimentos de origem animal, foi detectada resistência à AMP no isolado oriundo de amostra de língua suína (137EC).

Os resultados de detecção de AMO e AMP em isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos diferem dos resultados descritos por SANTOS et al. (2018), que detectaram sensibilidade à ampicilina em 100% dos isolados de *E. coli* oriundos de amostras coletadas ao longo da cadeia de produção de carne bovina em um abatedouro-frigorífico localizado no Mato Grosso, indicando maior circulação de resistência a aminopenicilinas na região do Distrito Federal analisada no presente estudo.

Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves, 03 dos 05 isolados apresentaram resistência fenotípica concomitante à AMO e à AMP (36EC, 39EC e 50EC). Os outros dois isolados apresentaram resistência à AMP e sensibilidade intermediária à AMO (33EC) e resistência à AMO e sensibilidade intermediária à AMP (37EC) (Tabela 2). Esses resultados observados em isolados oriundos da cadeia de produção de aves corroboram com os dados apresentados por SOUSA et al. (2024) que apontaram a resistência à ampicilina como a terceira resistência mais prevalente a nível global em isolados oriundos de aves, indicando ampla circulação de *E. coli* resistentes a esse antimicrobiano na cadeia de produção de aves.

Os resultados de resistência fenotípica a AMO e AMP observados em isolados oriundos de amostras relacionadas à cadeia de produção de alimentos de origem suína demonstraram alta ocorrência de resistência a esses antimicrobianos, em que a maioria dos isolados oriundos de carcaças suínas e ambientes de abatedouros de suínos, além da amostra oriunda de linguiça suína, apresentaram resistência fenotípica a esses antimicrobianos (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com os estudos que detectaram alta taxa de resistência à AMO em isolados oriundos de amostras da cadeia de produção de carne suína em São Paulo (SAMPAIO et al., 2024), sugerindo ampla disseminação de resistência a esse antimicrobiano na cadeia de produção suína, o que pode representar riscos à saúde pública.

Com relação à detecção de resistência fenotípica às cefalosporinas testadas no presente estudo, foi detectada resistência em maior frequência com relação às cefalosporinas de primeira geração quando comparadas com a cefalosporina de terceira geração. Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos, foram detectados fenótipos de resistência à CFE em 02 dos 07 isolados oriundos dessa fonte (3EC e 16EC). Com relação à CFZ, foram detectados 04 isolados resistentes a esse antimicrobiano,

oriundos dessa fonte (3EC, 16EC, 17EC e 138EC), e 01 isolado apresentou sensibilidade intermediária a esse antimicrobiano (139EC). A resistência fenotípica à CAZ em isolados oriundos dessa fonte foi observada em 02 isolados (3EC e 16EC) e sensibilidade intermediária em outros 2 isolados oriundos dessa fonte (17EC e 139EC). O isolado 3EC, oriundo de ambiente de abatedouros de bovinos, apresentou resistência fenotípica às três cefalosporinas testadas (Tabela 2). Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, foi detectada resistência à CFE e CFZ em 03 isolados (36EC, 39EC e 50EC), e resistência à CFZ em 01 isolado (33EC). Não foi detectado fenótipo de resistência à CAZ nos isolados oriundos de abatedouros de aves, porém, todos os 05 isolados oriundos dessa fonte apresentaram sensibilidade intermediária à essa cefalosporina. Nos isolados oriundos de carcaças suínas, apenas 01 isolado apresentou resistência fenotípica a CFZ e CAZ (83EC). Nos isolados oriundos de ambiente de abatedouros de suínos, 01 dos isolados apresentou resistência a CFE e CFZ (131EC), outros 03 apresentaram resistência a CFZ (115EC, 117EC e 119EC), e 01 isolado apresentou resistência à CFE (116EC). Não foi detectada resistência a CAZ nos isolados oriundos dessa fonte. Com relação aos isolados oriundos de alimentos de origem animal, foi detectada resistência à CFZ no isolado 137EC, oriundo de amostra de linguiça suína. Os resultados de detecção de RA em isolados de todas as fontes analisadas no presente estudo, ainda que em menor frequência quando comparadas com outros antimicrobianos testados como tetraciclinas, sulfonamidas e aminopenicilinas, representam riscos à saúde da população, uma vez que são antimicrobianos de ampla utilização na terapêutica humana e animal (HORNISH; KATARSKI, 2005; DUAN et al., 2021). Especial atenção deve ser dada à detecção de resistência à CAZ em 02 isolados de *E. coli* oriundos de ambiente de abatedouro de bovinos (3EC e 16EC) e 01 isolado oriundo de carcaça de suíno (83EC). Trata-se de uma droga de especial atenção, que está listada como prioridade para vigilância em RA em

isolados de *E. coli* pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022a). Os resultados encontrados no presente estudo evidenciam a necessidade de vigilância sobre as práticas de uso de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos como aminopenicilinas e cefalosporinas na cadeia de produção de alimentos de origem animal na região do Distrito Federal e Entorno.

Os resultados de fenótipo de RA e detecção de genes de resistência antimicrobiana nos isolados analisados no presente estudo apresentaram padrões amplamente heterogêneos de resistência antimicrobiana fenotípica e de presença de genes de resistência. Os isolados 88EC e 91EC, cujo resultado de homologia pelo RAPD foi de 100%, apresentaram o mesmo padrão fenotípico de resistência antimicrobiana, porém, no isolado 91EC, foi detectado o gene *ampC*, o que não ocorreu no isolado 88EC (Tabela 2). De modo semelhante, os isolados com 100% de homologia entre si 125EC e 130EC apresentaram perfis de RA bastante distintos, mas o mesmo gene de resistência (*tet(A)*) foi detectado em ambos os isolados (Tabela 2). Esses resultados reforçam a ampla heterogeneidade dos isolados de *E. coli* presentes nos ambientes de abatedouros de aves, bovinos e suínos, carcaças suínas e alimentos de origem animal na região do Distrito Federal e Entorno, evidenciando as trocas genéticas que ocorrem entre esses microrganismos e levam à disseminação de genes de RA na região, representando riscos à saúde pública.

O gene *ampC*, associado à produção de β -lactamase de classe C (*ampC*), foi detectado em 18 dos 31 isolados de *E. coli* analisados, estando associados a fenótipo de resistência a pelo menos um dos 05 β -lactâmicos testados em 13 desses isolados (Tabela 2). Em 02 isolados, a presença do gene estava associada à sensibilidade intermediária a algum dos β -lactâmicos testados (5EC e 139EC). Em 03 isolados, 140EC, 75EC e 136EC, o gene *ampC* foi detectado, mas não houve detecção de fenótipo de resistência ou de

sensibilidade intermediária a nenhum dos β -lactâmicos testados. A detecção do gene *ampC* em isolados de *E. coli* oriundos das fontes analisadas no presente estudo indicam a circulação desse gene na região. Bactérias produtoras de *ampC* possuem maior espectro de inibição de β -lactâmicos do que produtoras de ESBLs, e a expressão de *ampC* pode ser induzida pelo tratamento antimicrobiano, levando a um grande desafio na terapêutica associado aos problemas associados com o atual quadro da RA no contexto da saúde pública (HARRIS; FERGUSON, 2012). Os resultados de detecção de sensibilidade intermediária à CAZ em todos os isolados oriundos de ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, nos quais em 04 deles foi detectado o gene *ampC*, podem representar riscos à saúde pública em função da possibilidade de indução de resistência terapêutica (HARRIS; FERGUSON, 2012). Não foi detectada presença de *ampC* plasmidial em nenhum dos isolados de *E. coli* analisado no presente estudo. A presença de *ampC* em plasmídeos facilita a disseminação do gene, porém sua detecção mesmo que em DNA não plasmidial representa um risco pela possibilidade de disseminação do gene por transdução ou conjugação. Desse modo, a detecção desse gene, associado ou não ao fenótipo de RA em isolados de *E. coli* oriundos de fontes da cadeia de produção de alimentos de origem animal, pode representar um risco potencial para a saúde pública.

Os resultados de detecção de isolados produtores de ESBLs mostraram que a fonte em que mais frequentemente se detectou isolados capazes de produção de ESBLs foi em isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, em que 04 dos 07 isolados foram positivos para esse teste (Tabela 2), sendo que os 04 isolados apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária à pelo menos dois antimicrobianos β -lactâmicos testados no presente estudo. Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, 02 dos 05 isolados apresentaram produção de ESBLs (33EC e 50EC), e em ambos foram detectadas resistências fenotípicas a aminopenicilinas e

cefalosporinas. Com relação aos isolados oriundos de carcaças de suínos, 02 dos 08 isolados apresentaram produção de ESBLs (68EC e 83EC), ambos apresentando fenótipo de resistência a pelo menos uma das aminopenicilinas e cefalosporinas testadas. O isolado 68EC, oriundo de carcaça de suíno, também apresentou o gene *blaSHV*, relacionado à produção de ESBLs. Dos 09 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, 02 apresentaram produção de ESBLs no teste por disco aproximação (117EC e 119EC), sendo que ambos apresentaram resistência fenotípica a aminopenicilinas e a cefalosporinas. Os 02 isolados oriundos dos alimentos de origem animal deste estudo não apresentaram produção de ESBLs.

Com exceção do isolado 68EC, em nenhum outro isolado foi detectado o gene *blaSHV*, relacionado à produção de ESBLs. São vários os genes relacionados à produção de ESBLs, que são divididos em diferentes famílias, como os genes TEM, SHV, CTX-M, dentre outros (CASTANHEIRA et al., 2021). Desse modo, outros genes não pesquisados no presente estudo podem estar presentes nos isolados que apresentaram produção de ESBLs, mas nos quais o gene *blaSHV* não foi detectado.

A pesquisa de produção de ESBLs e caracterização de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs é de grande interesse para a saúde pública e tem sido feita a partir de diferentes fontes ao longo dos anos no Brasil (GAZAL et al., 2021; SONCINI et al., 2022; DA SILVA et al., 2023), evidenciando a importância da vigilância da disseminação de isolados produtores de ESBLs em diferentes fontes relacionadas à cadeia de produção de alimentos de origem animal, para que sejam obtidos dados que permitam melhores direcionamentos das políticas públicas e práticas das indústrias para mitigação dos riscos inerentes à presença desses microrganismos na cadeia de produção.

Apenas 05 dos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo não foram classificados como multirresistentes (MRA) (Tabela 2). Foi observada MRA em 03 dos

07 isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos e em 01 dos isolados oriundos de alimentos de origem animal (isolado 137EC, oriundo de amostra de linguiça suína). Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, de suínos e isolados oriundos de carcaças suínas, todos os isolados analisados apresentaram MRA. A alta disseminação de isolados que apresentaram MRA nas diferentes fontes analisadas no presente estudo são preocupantes, especialmente considerando isolados oriundos de carcaças suínas e de alimento de origem animal, uma vez que a presença de isolados com essas características limitam fortemente as opções terapêuticas em caso de infecções, além de serem importantes reservatórios para genes de RA que circulam nos ambientes das cadeias de produção de alimentos analisadas no presente estudo, levando à riscos para a saúde pública.

Os resultados de pesquisa de fenótipos de RA, detecção de genes de RA e detecção de produção de ESBLs descritos no presente estudo sugerem a disseminação de isolados de *E. coli* resistentes presentes em ambientes de abatedouros de bovinos, suínos e aves, carcaças suínas e alimentos de origem animal na região do Distrito Federal e Entorno, e que apresentam características fenotípicas e genotípicas preocupantes para a saúde pública. A detecção de *E. coli* multirresistentes e produtoras de ESBLs e AmpC é considerada um dos principais indicadores para estimação de risco à saúde pública nos diferentes setores que englobam a Saúde Única (POIREL et al., 2018), explicitando a importância da vigilância de ocorrência de MRA, ESBLs e ampC em isolados oriundos de fontes relacionadas com a cadeia de produção de alimentos de origem animal descritos no presente estudo. É especialmente importante destacar a observação de MRA em 26 dos 31 isolados analisados no presente estudo, em especial isolados oriundos de carcaças suínas e ambientes de abatedouros de aves e de suínos, onde 100% dos isolados oriundos dessas fontes foram classificados como multirresistentes (Tabela 2). Dentre os 26 isolados

multirresistentes detectados neste estudo, em 08 deles foi também detectada produção de ESBLs (16EC, 17EC, 33EC, 50EC, 68EC, 83EC, 117EC e 119EC), e dentre os quais, 05 apresentaram o gene *ampC* (16EC, 33EC, 50EC, 68EC e 83EC). Considerando a importância da vigilância e mitigação dos riscos associados à RA no contexto da Saúde Única, os resultados apresentados neste estudo demonstram potenciais riscos à saúde pública associados à circulação de microrganismos resistentes e potencial exposição da população aos mesmos, e contribuem com importantes dados auxiliares na vigilância, avaliação e implementação de programas e políticas para enfrentamento dessa crise da saúde pública no contexto da cadeia de produção de alimentos de origem animal, especialmente associados à abatedouros de suínos, aves e bovinos na região do Distrito Federal e Entorno.

6.6. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*

O único isolado de *L. monocytogenes* apresentou resistência fenotípica a 4 das 10 bases de antimicrobianos testadas, sendo elas eritromicina (ERI), meropenem (MER), sulfonamidas (SUL) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT), sendo, portanto, classificada como um isolado multirresistente. Com relação aos genes de resistência antimicrobiana (RA) pesquisados, não foi detectado nenhum dos genes relacionados à RA no isolado de *L. monocytogenes* pesquisados no presente estudo (Quadro 4). Os resultados do antibiograma e da pesquisa de genes de RA do isolado de *L. monocytogenes* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados do antibiograma pelo método de difusão em disco dos isolados de *Listeria monocytogenes*.

Isolado	Fenótipo de resistência antimicrobiana				Genes de resistência antimicrobiana
	R	I	S		
1LM	ERI SUL	MER SUT	CIP	AMP CLO DOX GEN TET	-

R = resistente; I = resistência intermediária; S = sensível

A detecção de RA fenotípica no isolado de *L. monocytogenes* descrita no presente estudo está de acordo com resultados descritos em outras pesquisas que descrevem a detecção de RA em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de fontes relacionadas à cadeia de produção de alimentos de origem animal, como a detecção de resistência a CIP, ERI e SUL em isolados oriundos de cortes bovinos e ambientes de abatedouros de bovinos na região do Distrito Federal, descritos por PALMA e colaboradores (2016).

O resultado de sensibilidade à ampicilina (AMP) detectado no presente estudo é favorável, uma vez que penicilina e aminopenicilinas são as primeiras opções de antibioticoterapia em casos de listeriose humana (KOOPMANS et al., 2022). Porém, a segunda alternativa é a utilização de sulfametoxazol/trimetropim (KOOPMANS et al., 2022), para o qual o isolado descrito no presente estudo apresentou resistência fenotípica. Os macrolídeos como eritromicina (ERI) e meropenem (MER) também são alternativas no tratamento da listeriose humana (KOOPMANS et al., 2022), e a detecção de resistência aos mesmos no isolado oriundo de alimento de origem animal pode restringir opções terapêuticas e apresentar riscos para a saúde pública.

Não foram detectados nenhum dos genes de resistência antimicrobiana pesquisados no presente estudo no isolado de *L. monocytogenes* analisado. Esses resultados diferem dos apresentados por DAVANZO et al (2021), que descrevem a presença de genes de resistência antimicrobiana como *tet(C)*, *tet(M)* e *erm(B)* em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de ambientes de abatedouro de aves no Distrito Federal e

Entorno. A detecção de resistência fenotípica sem a detecção de genes de resistência antimicrobiana, como o fenótipo de resistência à ERI sem a detecção de genes *ermA*, *ermB*, *ermC* ou *ereA*, ou a detecção de resistência fenotípica à SUL sem a detecção do gene *sul1*, pode estar relacionada com a presença de outros genes relacionados à resistência a esses antimicrobianos não pesquisados no presente estudo.

Considerando que a principal via de transmissão da listeriose humana é pela ingestão de alimentos contaminados (KOOPMANS et al., 2022), os resultados de detecção desse isolado oriundo de amostra de alimento de origem animal apresentando multirresistência antimicrobiana é importante, e pode representar um risco à saúde pública, tanto por representar um potencial desafio para a terapêutica, como por denotar a circulação de estirpes resistentes na região. É também importante considerar o papel de isolados que apresentam RA como reservatórios de genes de resistência que podem ser transferidos entre diferentes microrganismos, como é o caso de transferências horizontais entre diferentes espécies de *Listeria* e outros gêneros como *Streptococcus* e *Enterococcus* (CHARPENTIER; COURVALIN, 1999), evidenciando a importância da vigilância em RA em *L. monocytogenes* oriundas de alimentos de origem animal.

6.7. Detecção da expressão de curli e celulose nos isolados de *Escherichia coli* pelo teste do Vermelho Congo

Foram observados 4 morfotipos diferentes nos 31 isolados de *E. coli* analisados, segundo CIMDINS & SIMM (2017), sendo eles:

- RDAR (*red, dry and rough*; vermelho, seco e rugoso), indicando presença de curli e celulose;

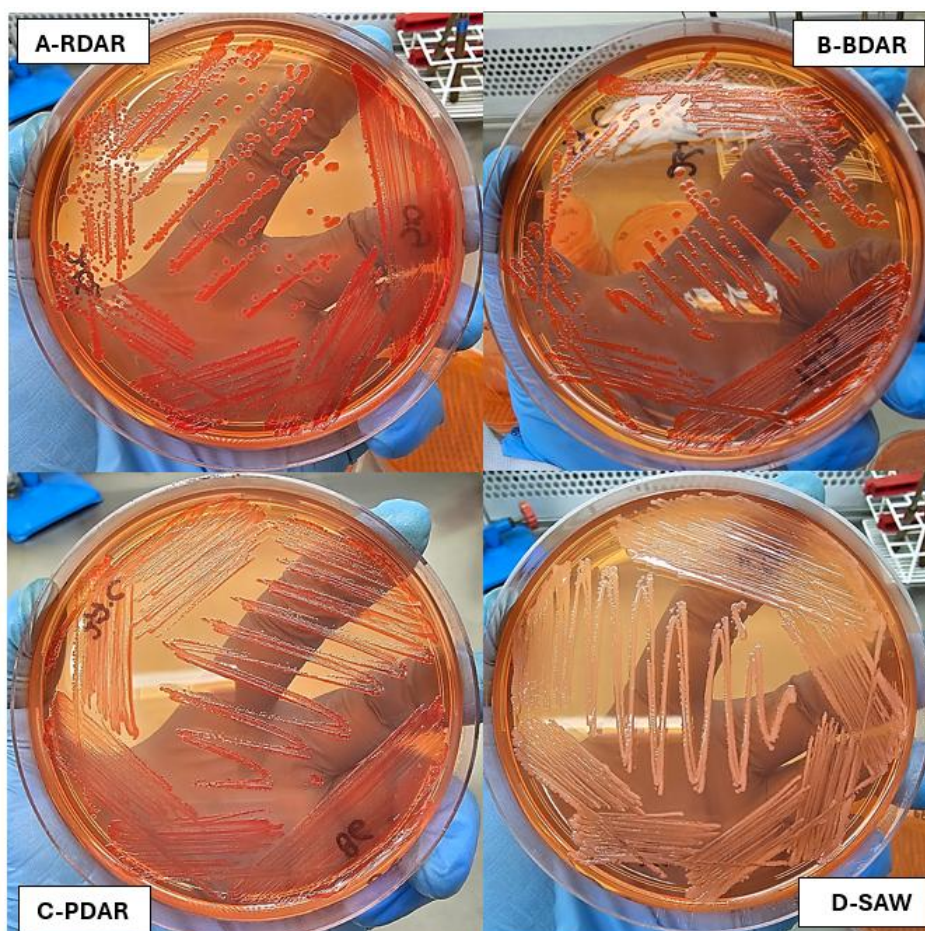
- PDAR (*pink, dry and rough*; rosa, seco e rugoso), indicando presença de celulose;

- BDAR (*brown, dry and rough*; marrom, seco e rugoso), indicando presença de curli;

- SAW (*smooth and white*; lisa e branca), indicando ausência de curli e celulose.

A Figura 3 ilustra um exemplo de cada morfotipo observado no presente estudo. Os resultados de morfotipos e de produção de curli e celulose, observados para cada isolado de *E. coli* analisado a 37°C e a 24°C com 24, 48 e 72 horas de incubação, em cada uma das duas temperaturas testadas, estão descritos nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Nas condições de incubação à 37°C, foi observada a expressão de curli e/ou celulose em 28 dos 31 isolados de *E. coli* em pelo menos um dos tempos analisados (Tabela 4). Os isolados 5EC, 67EC e 122EC mantiveram o morfotipo SAW, indicando ausência de expressão de curli e celulose, em todos os tempos analisados nessa condição de temperatura. Com relação à incubação a 24°C, os isolados 67EC e 122EC também não expressaram curli ou celulose em nenhum dos tempos analisados. O isolado 5EC, porém, expressou celulose já com 24 horas de incubação nessa temperatura (Tabela 5). O isolado 36EC apresentou fenótipo de expressão de curli a partir de 48 horas de incubação a 37°C (Tabela 4). Porém, nas condições de incubação a 24°C, o isolado não expressou curli ou celulose em nenhum dos tempos analisados (Tabela 5). Nas condições de incubação a 37°C, 03 dos 31 isolados de *E. coli* apresentaram o morfotipo RDAR, relacionado à produção de curli e celulose, já a partir de 24 horas de incubação (50EC, 91EC e 134EC). Nessas condições de incubação, o isolado 74EC, que até as 48 horas de incubação apresentou expressão apenas de celulose (fenótipo PDAR), passou a expressar curli com 72 horas de incubação (fenótipo RDAR) (Tabela 4). Nas condições de incubação a 24°C, os isolados 130EC, 139EC e 140EC expressaram curli e celulose a partir de 24 horas de



A- RDAR (red, dry and rough/vermelha, seca e rugosa), **B- BDAR** (brown, dry and rough/marrom, seca e rugosa), **C- PDAR** (pink, dry and rough/rosa, seca e rugosa), **D- SAW** (smooth and white/lisa e branca).

Figura 3 – Morfotipos dos isolados de *Escherichia coli* observados no teste do Vermelho Congo. **A:** estirpe 50EC (RDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. **B:** estirpe 125EC (BDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. **C:** estirpe 86EC (PDAR) após 24 horas de incubação a 37°C. **D:** estirpe 67EC (SAW) após 24 horas de incubação a 37°C.

incubação. Os isolados 50EC e 91EC, que apresentaram morfotipo RDAR a partir de 24 horas a 37°C, apresentaram morfotipo RDAR a 24°C a partir de 48 horas de incubação. Após 72 horas de incubação, 04 isolados apresentaram morfotipo RDAR a 37°C (50EC, 74EC, 91EC e 134EC), enquanto que a 24°C, após 72 horas de incubação, 09 isolados apresentaram esse morfotipo (50EC, 74EC, 88EC, 91EC, 119EC, 125EC, 130EC, 139EC e 140EC). Esses resultados estão de acordo com os esperados, uma vez que condições de

Tabela 4- Resultados de morfotipo e expressão de curli e celulose no teste do Vermelho Congo dos 31 isolados de *Escherichia coli* analisados na temperatura de 37°C após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Temperatura		37°C							
Tempo de incubação		24h		48h		72h			
Identificação dos isolados	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose
3EC-A	SAW	-	-	PDAR	-	+	PDAR	-	+
5EC-A	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
16EC-A	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
17EC-A	SAW	-	-	PDAR	-	+	PDAR	-	+
138EC-A	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
139EC-A	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
140EC-A	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
33EC-B	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
36EC-B	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
37EC-B	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
39EC-B	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
50EC-B	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
67EC-C	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
68EC-C	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
74EC-C	PDAR	-	+	PDAR	-	+	RDAR	+	+
75EC-C	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
83EC-C	SAW	-	-	PDAR	-	+	PDAR	-	+

86EC-C	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
88EC-C	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
91EC-C	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
115EC-D	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
116EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
117EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
119EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
122EC-D	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
125EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
130EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
131EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
134EC-D	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
136EC-E	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
137EC-E	SAW	-	-	SAW	-	-	BDAR	+	-

RDAR (red, dry and rough) - vermelha, seca e rugosa **BDAR** (brown, dry and rough) – marrom, seca e rugosa **PDAR** (pink, dry and rough) – rosa, seca e rugosa **SAW** (smooth and white) – lisa, branca e mucosa

A- Ambiente de abatedouro de bovinos

B- Ambiente de abatedouro de aves

C- Carcaça suína

D- Ambiente de abatedouro de suíno

E- Alimento de origem animal

Tabela 5- Resultados de morfotipo e expressão de curli e celulose no teste do Vermelho Congo dos 31 isolados de *Escherichia coli* analisados na temperatura de 24°C após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Temperatura		24°C							
Tempo de incubação		24h		48h		72h			
Identificação dos isolados	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose	Morfotipo	Expressão de curli	Expressão de celulose
3EC-A	SAW	-	-	SAW	-	-	PDAR	-	+
5EC-A	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
16EC-A	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
17EC-A	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
138EC-A	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
139EC-A	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
140EC-A	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
33EC-B	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
36EC-B	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
37EC-B	SAW	-	-	SAW	-	-	BDAR	+	-
39EC-B	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
50EC-B	BDAR	+	-	RDAR	+	+	RDAR	+	+
67EC-C	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
68EC-C	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
74EC-C	PDAR	-	+	PDAR	-	+	RDAR	+	+
75EC-C	SAW	-	-	SAW	-	-	BDAR	+	-
83EC-C	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+

86EC-C	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
88EC-C	PDAR	-	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
91EC-C	PDAR	-	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
115EC-D	SAW	-	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
116EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
117EC-D	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+
119EC-D	PDAR	-	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
122EC-D	SAW	-	-	SAW	-	-	SAW	-	-
125EC-D	PDAR	-	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
130EC-D	RDAR	+	+	RDAR	+	+	RDAR	+	+
131EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
134EC-D	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
136EC-E	BDAR	+	-	BDAR	+	-	BDAR	+	-
137EC-E	PDAR	-	+	PDAR	-	+	PDAR	-	+

RDAR (red, dry and rough) - vermelha, seca e rugosa
SAW (smooth and white) – lisa, branca e mucosa

BDAR (brown, dry and rough) – marrom, seca e rugosa

PDAR (pink, dry and rough) – rosa, seca e

A- Ambiente de abatedouro de bovinos **B-** Ambiente de abatedouro de aves **C-** Carcaça suína **D-** Ambiente de abatedouro de suíno **E-** Alimento de origem animal

baixas temperaturas levam à expressão do gene *csgA*, responsável pela produção de curli (OLSÉN et al., 1993). A expressão de celulose nos isolados analisados também foi consideravelmente maior a 24°C do que a 37°C (Tabelas 5 e 6). Apesar dessa diferença, os resultados de capacidade de expressão de curli e celulose a 37°C descritos no presente estudo podem representar um risco à população, uma vez que se trata de isolados capazes de expressar essas duas estruturas em temperaturas próximas à temperatura corporal humana. Um estudo analisou a adesão celular e capacidade de formação de biofilme de EHECs e EPECs e demonstrou o papel sinérgico entre curli e celulose na aderência desses isolados, podendo facilitar a colonização do hospedeiro (SALDAÑA et al., 2009). De modo semelhante, KIKUCHI e colaboradores (2005) demonstraram maior capacidade de isolados de *E. coli* que expressaram curli a 37°C em aderir a células de linhagem uroepitelial humana. Estudos indicam também o papel pró inflamatório da expressão de curli em humanos (BIAN et al., 2000). Desse modo, a detecção dessas estruturas em isolados oriundos de diferentes cadeias de produção de alimentos de origem animal relacionado a aves, bovinos e suínos pode representar uma melhor adaptação ambiental desses isolados e um potencial risco à saúde ao serem capazes de expressar curli e celulose a 37°C.

Os isolados de *E. coli* oriundos de alimentos de origem animal (136EC e 137EC) não apresentaram expressão de curli em nenhuma das condições testadas no presente estudo, tendo produzido apenas celulose em todas as condições (Tabelas 5 e 6). Todas as outras fontes analisadas apresentaram isolados capazes de expressar curli e celulose em alguma das condições testadas. Na condição de temperatura a 37°C, foi observado morfotipo RDAR em isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves (50EC) e suínos (134EC), e em isolados oriundos de carcaças suínas (74EC e 91EC). Na condição de temperatura de 24°C, foi detectado morfotipo RDAR em isolados oriundos de

ambientes de abatedouros de aves (50EC), suínos (119EC, 15EC e 130EC) e bovinos (139EC e 140EC) e de carcaças de suínos (74EC, 88EC e 91EC), sugerindo que não há correlação entre a origem do isolado e sua capacidade de expressar o morfotipo RDAR. O morfotipo RDAR é associado a isolados com maior capacidade de formação de biofilme e melhores adaptações de sobrevivência a condições ambientais adversas (WHITE et al., 2006; CIMDINS; SIMM, 2017; ROSSI et al., 2018), e os resultados de detecção de isolados capazes de produzir curli e celulose descritos no presente estudo, a partir de origens tanto ambientais como em carcaças suínas representa um risco ao demonstrar a circulação de isolados potencialmente capazes de se adaptar melhor às condições ambientais ao expressar essas estruturas amiloides.

Os isolados 125EC e 130EC, que apresentaram 100% de homologia na análise de variabilidade genética pelo RAPD, expressaram o mesmo morfotipo nos diferentes tempos analisados a 37°C (Tabela 4), e na temperatura de 24°C, expressaram o mesmo morfotipo a partir das 48 horas de incubação (Tabela 5). Os isolados 88EC e 91EC mostraram diferença na produção de curli a 37°C, uma vez que o isolado 88EC não expressou essa estrutura nessa temperatura, enquanto o isolado 91EC expressou curli e celulose nessa condição de temperatura (Tabela 4). Nas condições avaliadas na temperatura de 24°C, ambos os isolados apresentaram os mesmos morfotipos, expressando o padrão RDAR a partir de 48 horas de incubação (Tabela 5). Esses resultados sugerem que, apesar da homologia e da capacidade de expressar tanto curli quanto celulose desses isolados, e também de expressarem as mesmas estruturas na maioria das condições de temperatura e tempo testados, em algumas situações analisadas, as condições ambientais de temperatura e tempo de incubação levou a expressões de produção de curli e celulose distintas entre os dois isolados homólogos. A regulação da expressão de curli e celulose são processos altamente complexos e coordenados, que

possuem influência das condições externas como temperatura e osmolaridade (EVANS; CHAPMAN, 2014; RÖMLING; GALPERIN, 2015). Os resultados de diferentes expressões dos mesmos isolados ou de isolados homólogos nas diferentes condições testadas observados nesse estudo sugerem que possa ter ocorrido mutações adaptativas, ou que tenham sido alterados os processos regulatórios para cada isolado, o que levou a expressões distintas dessas estruturas amiloides.

6.8. Avaliação do padrão de adesão de isolados de *Escherichia coli* em células da linhagem Caco-2

Foram observados 03 padrões de adesão distintos nos 31 isolados de *E. coli* analisados no presente estudo. O padrão de adesão mais comumente observado foi a adesão localizada (LA) (Figura 4), presente em 83,87% dos isolados (26/31), seguido do padrão de adesão difusa (DA) (Figura 5) em 9,68% (3/31) e o padrão de adesão agregativa (AA) (Figura 6), observado em 6,45% dos isolados (2/31). Os resultados de padrão de adesão celular para cada isolado estão descritos na Tabela 6.

São poucos os trabalhos que verificam os padrões de adesão de *E. coli* no Brasil, e os existentes são oriundos de amostras clínicas humanas e estão concentrados nas regiões do Sudeste e Sul do país (VIEIRA et al., 2019; CANTARELLI et al., 2000; MONFARDINI et al., 2023) ou de amostras de água ambiental (SCHÜROFF; ANDRADE; PELAYO, 2022). Na região do Distrito Federal, existem dois estudos que realizaram a caracterização de padrões de adesão de *E. coli* oriundos de amostras clínicas de humanos (PEREIRA et al., 2007; MANSAN-ALMEIDA et al., 2013). Porém, não existem trabalhos que caracterizem os padrões de adesão celular de isolados de *E. coli* oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos, carcaças ou alimentos de origem

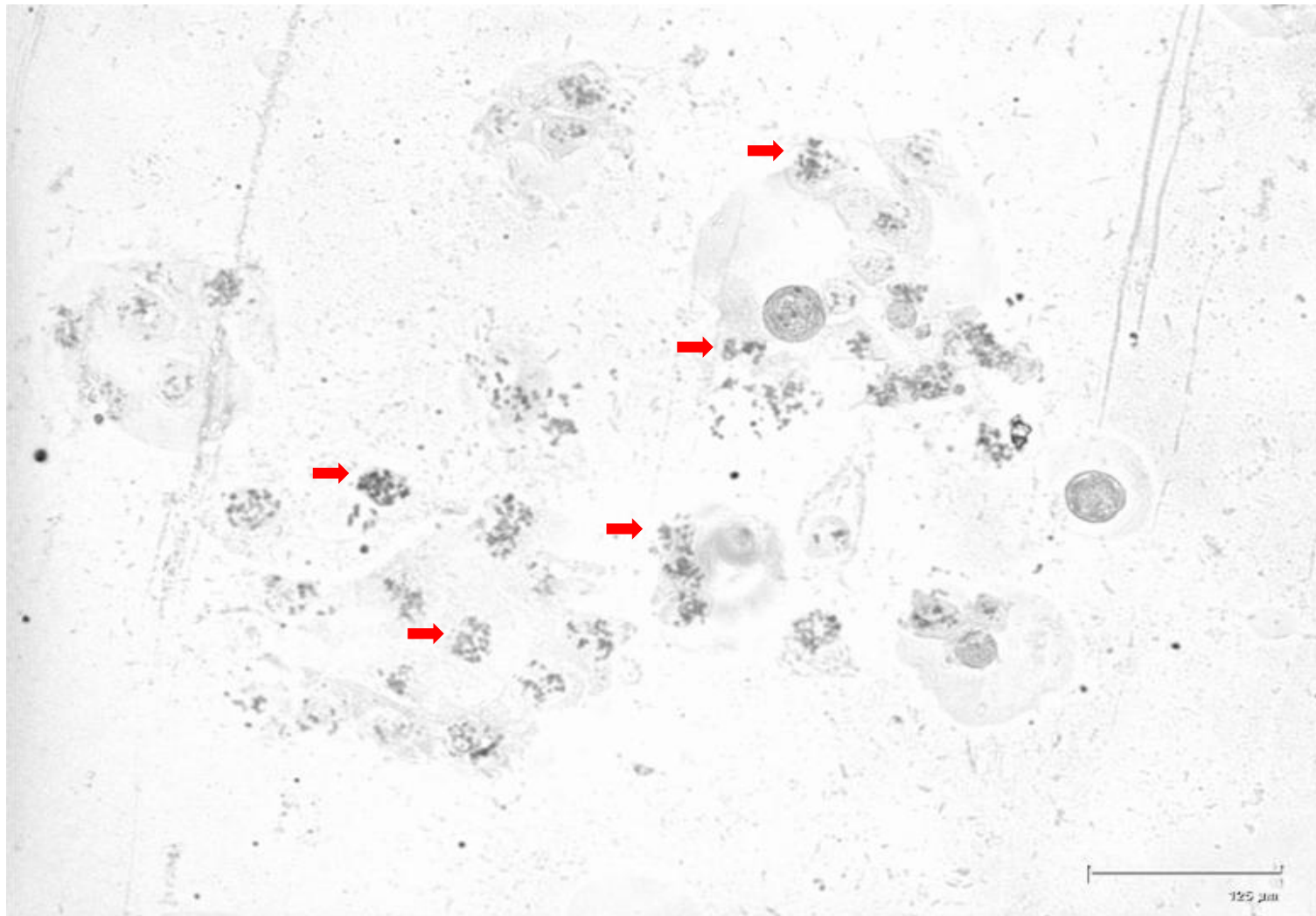


Figura 4 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão localizada (LA). Isolado 36EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125μM.

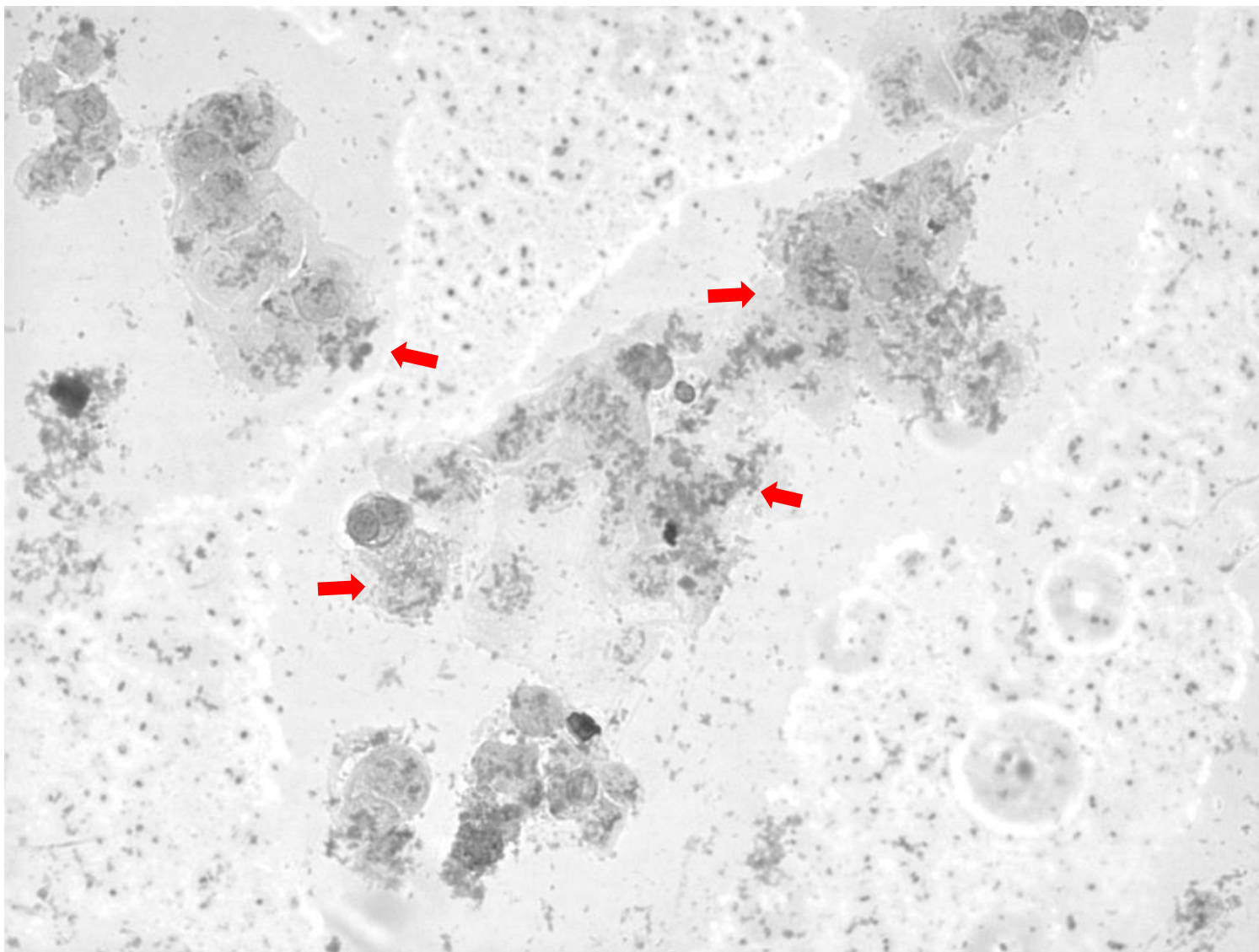


Figura 5 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão difusa (DA). Isolado 33EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125 μ M.

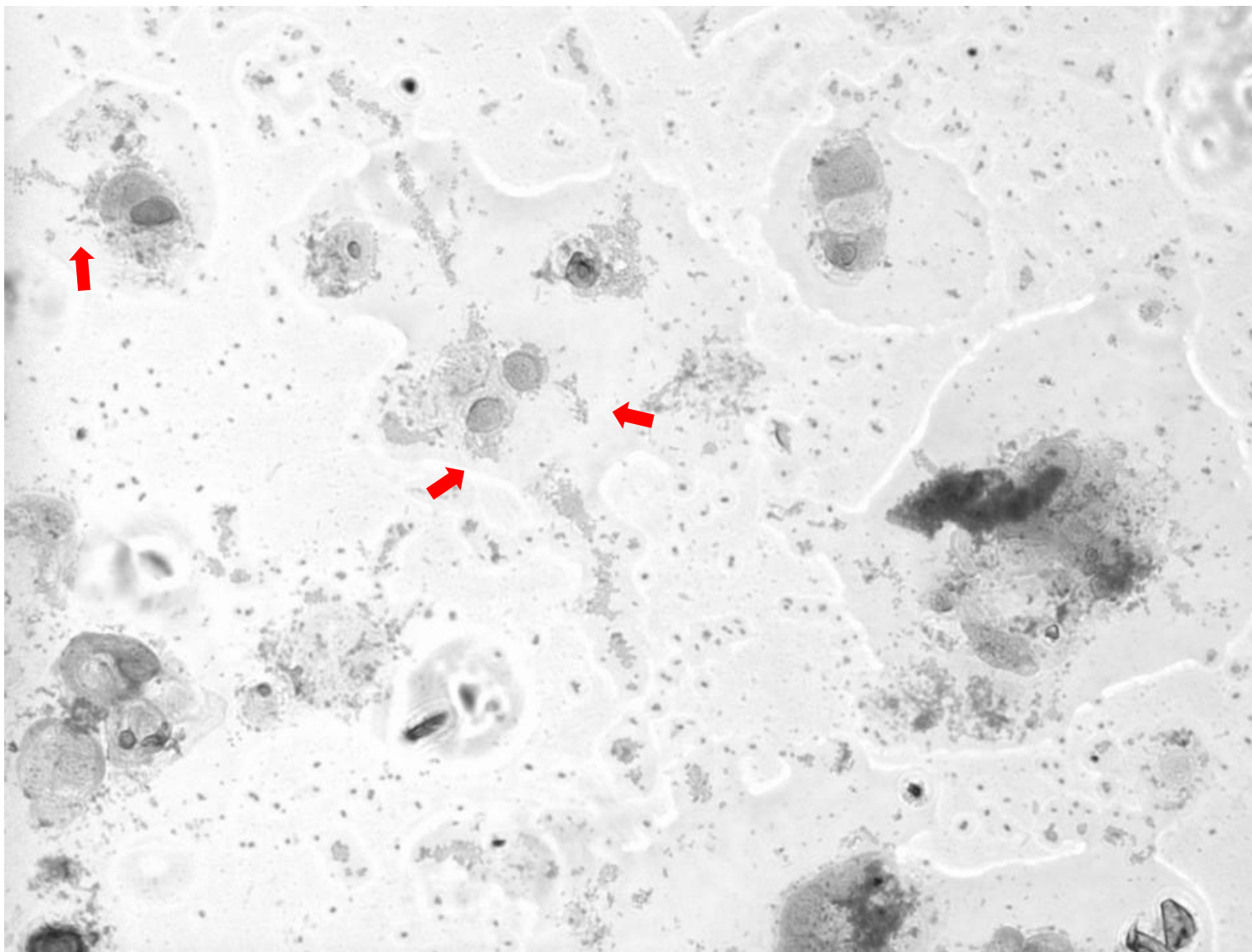


Figura 6 – Padrão de adesão observado em células da linhagem Caco-2 classificado como adesão agregativa (AA). Isolado 17EC. Lâminas coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, escala 125 μ M.

Tabela 6 - Resultados da avaliação do padrão de adesão em células da linhagem Caco-2 dos 31 isolados de *Escherichia coli*.

Identificação do isolado	Origem	Classificação	Genes de virulência	Padrão de adesão em células Caco-2
3EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	STEC	<i>saa stx-1</i>	LA
5EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	STEC	<i>saa stx-1</i>	LA
16EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	-	<i>saa</i>	LA
17EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	EAEC/STEC	<i>stx-1</i>	AA
138EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	DAEC	<i>saa Tir β</i>	DA
139EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	-	<i>saa Tir γ</i>	LA
140EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	STEC	<i>saa stx-2</i>	LA
33EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	<i>saa stx-1</i>	DA
36EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	<i>saa stx-1</i>	LA
37EC	Ambiente de abatedouro de aves	EPEC	<i>eae saa tir β</i>	LA
39EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	<i>hlyA saa stx-1</i>	LA
50EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	<i>stx-1</i>	LA
67EC	Carcaça de suínos	EHEC	<i>eae hlyA stx-1 stx-2</i>	LA
68EC	Carcaça de suínos	EAEC/STEC	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>	AA
74EC	Carcaça de suínos	STEC	<i>stx-1</i>	DA
75EC	Carcaça de suínos	STEC	<i>hlyA stx-1 tir α</i>	LA

83EC	Carcaça de suínos	EHEC	<i>eae hlyA saa stx-1 stx-2</i>	LA
86EC	Carcaça de suínos	STEC	<i>hlyA stx-2</i>	LA
88EC	Carcaça de suínos	STEC	<i>hlyA stx-2</i>	LA
91EC	Carcaça de suínos	STEC	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>	LA
115EC	Ambiente de abatedouro de suínos	STEC	<i>hlyA stx-1</i>	LA
116EC	Ambiente de abatedouro de suínos	EPEC	<i>eae hlyA</i>	LA
117EC	Ambiente de abatedouro de suínos	STEC	<i>saa stx-1</i>	LA
119EC	Ambiente de abatedouro de suínos	-	<i>tir α</i>	LA
122EC	Ambiente de abatedouro de suínos	-	<i>saa Tir γ</i>	LA
125EC	Ambiente de abatedouro de suínos	STEC	<i>stx-1</i>	LA
130EC	Ambiente de abatedouro de suínos	STEC	<i>stx-1</i>	LA
131EC	Ambiente de abatedouro de suínos	STEC	<i>stx-1</i>	LA
134EC	Ambiente de abatedouro de suínos	-	-	LA
136 EC	Queijo minas padrão	STEC	<i>stx-1</i>	LA
137EC	Linguiça suína	STEC	<i>hlyA stx-1 stx-2</i>	LA

LA – Adesão localizada **AA** – Adesão agregativa **DA** – Adesão difusa

animal, sendo este o primeiro a realizar essa caracterização em isolados oriundos dessas fontes, os quais fornecem dados sobre as características relacionadas ao potencial patogênico de estirpes circulantes nesses ambientes e alimentos nesta região.

Os resultados de detecção de padrões de adesão LA, como o mais comumente observado, nos isolados de *E. coli* analisados no presente estudo diferem dos descritos por PEREIRA et al. (2007), que não detectaram esse padrão de adesão em isolados de *E.*

coli oriundos de amostras clínicas de crianças saudáveis e com diarreia em Brasília, Distrito Federal. Os resultados do presente estudo também diferiram dos descritos por SCHÜROFF, ANDRADE & PELAYO (2022), que não detectaram o padrão de adesão LA em nenhum dos isolados de *E. coli* oriundos de amostras de água coletadas no estado do Paraná. Os dois isolados EPEC detectados no presente estudo, oriundos de ambiente de abatedouro de aves (37EC) e ambiente de abatedouro de suínos (116EC), apresentaram o padrão de adesão LA, característico desse patotipo (PEREIRA; GIUGLIANO, 2013). Esses resultados são similares aos descritos por VIEIRA et al. (2019) em isolados de EPEC atípicos oriundos de pacientes diarreicos no Brasil, que detectaram o padrão LA como o mais comumente observado, apesar de amostras de origem distintas. O padrão LA também foi detectado nos dois pares de isolados que apresentaram 100% de homologia na análise de padrões RAPD (88EC e 91EC/ 125EC e 130EC) (Figura 2, Tabela 6). Todos os quatro isolados que apresentaram o gene *eae* (37EC, 67EC, 83EC e 116EC, Tabela 6) apresentaram o padrão de adesão LA. Esses resultados estão de acordo com os resultados descritos por PELAYO et al. (1999), que observaram esse padrão de adesão em isolados de *E. coli eae* positivos.

Foi detectado o padrão de adesão AA em 02 isolados de *E. coli*, oriundos de ambiente de abatedouro de bovinos (17EC) e carcaça suína (68EC), sendo classificados como isolados EAEC. A detecção do padrão de adesão AA também foi descrita por PEREIRA et al. (2007) em isolados oriundos de amostras clínicas de crianças saudáveis e diarreicas no Distrito Federal. Ambos os isolados que apresentaram o padrão AA no presente estudo eram STEC (*stx-1* presente no isolado 17EC e genes *stx-1* e *stx-2* presentes no isolado 68EC). Esses resultados denotam a ocorrência de possíveis isolados com características híbridas EAEC/STEC. Isolados *hyPEC* tem sido constantemente descritos na literatura, como a EAEC O104:H4 causadora de surto de diarreia

hemorrágica e casos de Síndrome Hemolítica Urêmica na Alemanha em 2011, que era capaz de produzir shiga-toxina (SCHEUTZ et al., 2011). A detecção de dois isolados EAEC, comumente associados a diarreia em humanos, especialmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, contendo genes para produção de shiga-toxina é de grande importância para a saúde pública em função do risco potencial associado a esses isolados. Além dessas características, os isolados 17EC e 68EC apresentaram multirresistência antimicrobiana e expressão de produção de ESBLs (Tabela 2), evidenciando ainda mais o potencial risco à saúde pública representado pela detecção desses isolados na cadeia de produção de alimentos de origem animal no Distrito Federal. Estudos de expressão gênica e ensaios em modelos animais são necessários para detectar a patogenicidade desses isolados, porém a detecção de genes de virulência associados com o padrão de adesão característicos de EAEC são suficientes para fornecer dados sobre a variabilidade de estirpes em circulação, e também sobre o potencial risco oferecido à população na região estudada.

O padrão DA foi detectado em isolados oriundos de ambiente de abatedouro de bovinos (138EC), ambiente de abatedouro de aves (33EC) e carcaça de suíno (74EC). O padrão DAEC está associado com a presença de adesinas fimbriais e afimbriais e está associada a infecções intra e extraintestinais em humanos (SERVIN, 2014; MEZA-SEGURA et al., 2020), representando desta forma um potencial risco à população. Dois dos três isolados onde foi observado o padrão de adesão celular DA eram STECs (33EC e 74EC), assim classificados em função da presença do gene *stx-1* (Tabela 6), evidenciando a combinação de fatores de virulência típicos de isolados capazes de expressar o padrão de adesão DA com a presença de genes para produção de shiga-toxina. Além disso, dois desses isolados (33EC e 138EC) apresentaram o gene *saa* relacionado à adesina Saa.

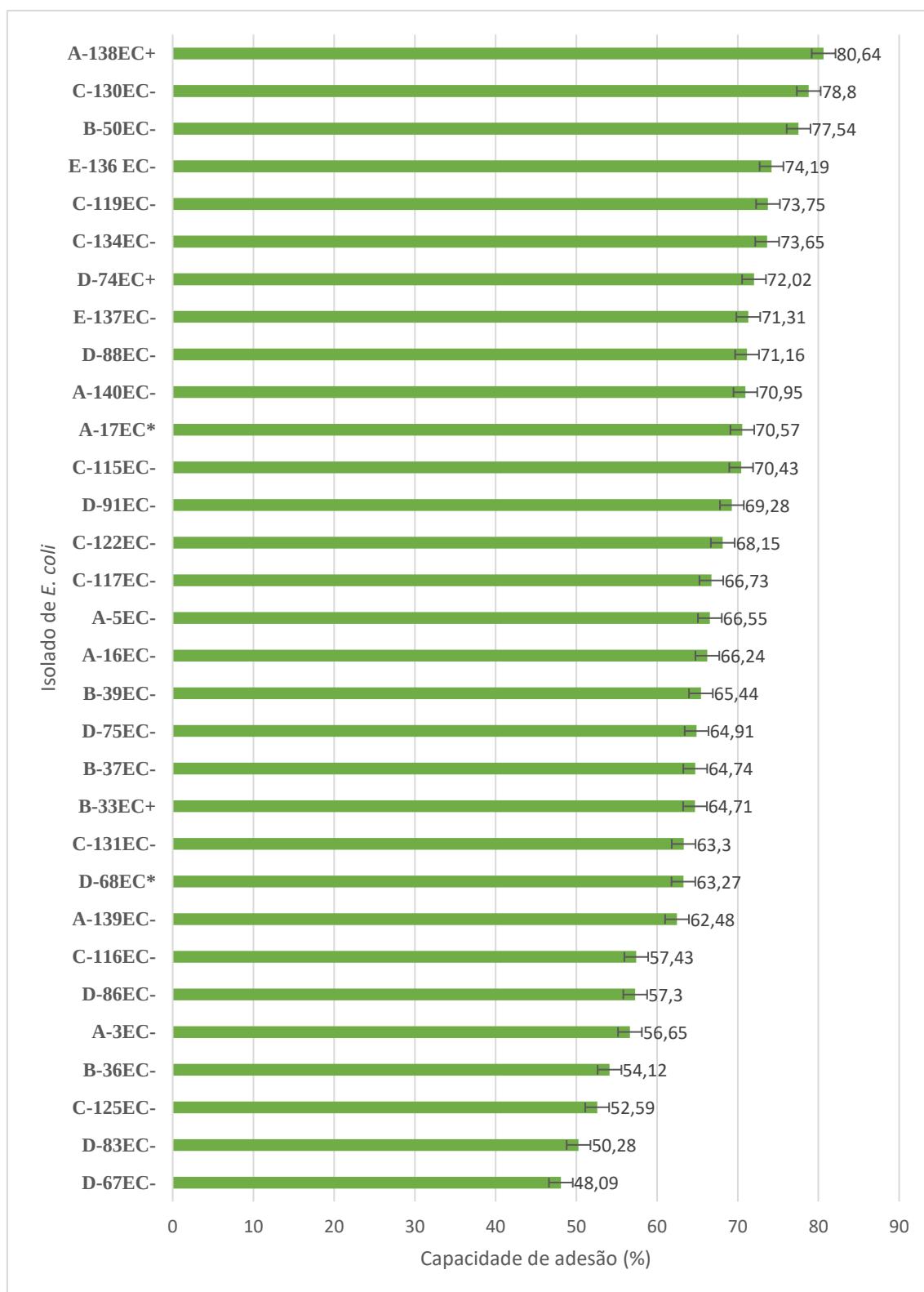
Não foi notada correlação entre o padrão de adesão celular observado nos isolados de *E. coli* e a expressão de curli e/ou celulose no teste do Vermelho Congo (VC). Os isolados que apresentaram o padrão de adesão celular LA expressaram diferentes padrões de curli e celulose nas diferentes condições testadas (Tabelas 5, 6 e 7). Os isolados que apresentaram o padrão de adesão celular AA (17EC e 68EC) também apresentaram padrões distintos de expressão de curli e celulose, apesar de se notar tendência à expressão de fímbrias nesses dois isolados na maioria das condições analisadas (Tabelas 5, 6 e 7). Apenas os isolados com padrão de adesão celular DA apresentaram consistentemente o mesmo padrão de expressão de curli em todas as condições testadas no teste de VC (Tabelas 5, 6 e 7). Esses resultados evidenciam a variabilidade genética presente nos isolados de *E. coli* circulantes nas fontes analisadas no presente estudo, levando a uma heterogeneidade de estirpes cujas características descritas no presente estudo fornecem informações para estudos epidemiológicos e para a vigilância em saúde pública tanto para a região analisada quanto para o país, uma vez que não há na literatura estudos que caracterizaram isolados de *E. coli* oriundos de alimentos de origem animal e ambientes de produção de alimentos de origem animal quanto ao seu padrão de adesão celular. Não foram encontrados na literatura científica estudos que tenham realizado a caracterização de padrões de adesão de *E. coli* oriundos de fontes que não sejam de amostras clínicas humanas na região do Centro-Oeste e, mais especificamente, no Distrito Federal, sendo esse o primeiro estudo a realizar essa caracterização em isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, bovinos e suínos, carcaças suínas e alimentos de origem animal nessa região.

6.9. Avaliação da capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2 dos isolados de *Escherichia coli*

Os resultados da capacidade de adesão dos diferentes isolados de *E. coli* em células da linhagem Caco-2 variaram entre 48,09% e 80,64% entre os 31 isolados analisados. A capacidade de adesão média foi de 66,04%. As porcentagens de capacidade de adesão de cada isolado estão descritas na Figura 7.

Não houve diferença considerável nas médias de capacidade de adesão para cada fonte analisada no presente estudo, com exceção dos 02 isolados oriundos de alimentos de origem animal (136EC e 137EC), que apresentaram médias de capacidade de adesão em células Caco-2 próximos de 72% e 75%, com desvio padrão de 2,04%. A capacidade de adesão média dos isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos variou entre 56,65% e 80,64%, com média de 67,72% e desvio padrão de 7,52%. Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, a capacidade de adesão celular variou entre 54,12% e 77,54%, com uma capacidade de adesão média de 65,31% e desvio padrão de 8,30%. Com relação aos isolados oriundos de ambiente de abatedouros suínos, a capacidade de adesão celular variou entre 52,59% e 78,8%, com capacidade de adesão média de 67,20% e desvio padrão de 8,33%. Por fim, a capacidade de adesão dos isolados oriundos de carcaças suínas variou entre 48,09% e 72,02%, com capacidade de adesão média de 62,04% e desvio padrão de 9,26%.

Os 02 isolados que apresentaram o padrão de adesão agregativa (AA) no ensaio de padrões de adesão em células da linhagem Caco-2 (17EC e 68EC) apresentaram 70,57% de capacidade de adesão para o isolado 17EC e 63,27% para o isolado 68EC (Figura 7), com um desvio padrão de 5,16%. Com relação aos 03 isolados que apresentaram o padrão de adesão celular difuso (DA), a capacidade de adesão em células da linhagem Caco-2 foi de 64,71% para o isolado 33EC, 72,02% para o isolado 74EC e 80,64% para o isolado 138EC (Figura 7), sendo esse último o isolado que apresentou maior capacidade de adesão celular entre os 31 isolados de *E. coli* analisados no presente



A- Isolado oriundo de ambiente de abatedouro de bovinos
 B- Isolado oriundo de ambiente de abatedouro de aves
 C- Isolado oriundo de abatedouro suíno
 D- Isolado oriundo de carcaça suína
 E- Isolado oriundo de alimento de origem animal

+: padrão de adesão celular AA
 -: padrão de adesão celular LA
 *: padrão de adesão celular AA

Figura 7 –Capacidade de adesão celular (%) e desvio padrão em células da linhagem Caco-2 dos 31 isolados de *Escherichia coli*.

estudo. Os isolados que apresentaram o padrão de adesão localizada (LA) variaram entre 78,08% (isolado 130E) e 48,09% (isolado 67EC), sendo a capacidade de adesão do isolado 130EC a segunda maior porcentagem descrita e a capacidade de adesão do isolado 67EC a menor capacidade de adesão celular descrita nos 31 isolados de *E. coli* analisados. O isolado 138EC foi classificado como DAEC em função do padrão de adesão celular observado no ensaio com células da linhagem Caco-2, associado à sua caracterização pela pesquisa de genes de virulência (Tabela 6). Os resultados de comparação das frequências da capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2 descritos no presente estudo indicaram que os isolados que apresentaram o padrão de adesão DA foram capazes de aderir em maior quantidade às células Caco-2 do que os isolados que apresentaram os padrões de adesão AA e LA, cujas médias de adesões foram de 72,46% nos isolados com padrão de adesão DA, comparados com 66,92% dos isolados com padrão de adesão AA e 65,23% para os isolados com padrão de adesão LA.

Os isolados nos quais o gene da adesina Saa foi detectado apresentaram ampla variedade de capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2, variando entre 50,28% e 80,64% (Tabela 6, Figura 7), com uma média de capacidade de adesão de 64,44%. Os isolados nos quais o gene *eae* foi detectado, por sua vez, apresentaram capacidade de adesão proporcionalmente menores, com uma média de 55,13%, indicando que não há associação quantitativa entre a presença desses genes relacionados à adesinas e intiminas e a capacidade de adesão celular.

Os isolados 50EC, 91EC, 74EC e 134EC, que apresentaram o morfotipo RDAR a 37°C, apresentaram capacidade de adesão maior do que a média (73,12%). Essa maior capacidade de adesão em células Caco-2 observada nesses isolados pode estar relacionada com capacidade de expressar estruturas amiloides associadas à capacidade de formação de biofilme em temperatura de 37°C, cuja expressão nessa temperatura pode representar

um risco para a saúde pública, tanto pela melhor adaptação de sobrevivência do isolado, quanto pela capacidade de expressão de citocinas pró inflamatórias em humanos associada à expressão de curli *in vivo* (BIAN et al., 2000; HUFNAGEL; TÜKEL; CHAPMAN, 2013).

Os isolados 88EC e 91EC, que apresentaram 100% de homologia na caracterização molecular por RAPD, apresentaram capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2 semelhantes (71,16% e 69,28% respectivamente, Figura 7). Diferentemente do que foi observado nesses dois isolados, os isolados homólogos 130EC e 125EC apresentaram capacidade de adesão celular consideravelmente distintas, onde o isolado 125EC apresentou capacidade de adesão celular de 52,59% e o isolado 130EC apresentou capacidade de adesão celular de 78,8% (Figura 7). Esses resultados demonstram a variabilidade genética e fenotípica das estirpes de *E. coli* presentes nos ambientes e alimentos analisados no presente estudo.

6.10. Avaliação da capacidade de adesão e invasão celular de *Listeria monocytogenes* em células da linhagem Caco-2

O único isolado de *L. monocytogenes* analisado foi capaz de aderir à superfície de células da linhagem Caco-2 em uma porcentagem de 63,71%. Com relação à capacidade de invasão celular, o isolado foi capaz de invadir células da linhagem Caco-2 em uma porcentagem de 85,1%.

Os resultados de capacidade de adesão e invasão de *L. monocytogenes* oriundos de alimentos de origem animal descritos no presente estudo corroboram os descritos por MEDEIROS et al. (2021), que detectaram isolados de *L. monocytogenes* oriundos de alimentos de origem animal e fontes relacionadas que demonstraram capacidade de

invasão celular em células da linhagem Caco-2. A capacidade de invasão detectada no presente estudo de 85,1%, porém, foi consideravelmente superior à capacidade de invasão celular observada por MEDEIROS et al. (2021), que variou entre 7,6% e 54,15%. Os resultados de capacidade de adesão e alta capacidade de invasão em células da linhagem Caco-2 do isolado de *L. monocytogenes* isolado a partir de alimento de origem animal descritos no presente estudo são importantes para a saúde pública, uma vez que a patogenia desse microrganismo está diretamente relacionada com sua capacidade de invasão celular (DISSON; MOURA; LECUIT, 2021). Considerando a alteração da legislação brasileira trazida pela Instrução Normativa nº 161 de 2022 com relação ao padrão microbiológico para *L. monocytogenes* em alimentos para consumo humano, que atualmente permite a presença de até 10^2 UFC/g ou mL de amostra de alimento (BRASIL, 2022), a alta capacidade de invasão celular observada no isolado descrito no presente estudo pode representar risco para a população, uma vez trata-se de um isolado com alta eficiência de invasão celular *in vitro*.

6.11. Sequenciamento do gene *inlA* de *Listeria monocytogenes*

Não foi detectada presença de stop códons prematuros (PMSCs) nos dois fragmentos do gene da internalina A sequenciados, oriundos do isolado de *L. monocytogenes* (Anexo 1). Foram detectadas 46 mutações nas sequências de nucleotídeos do isolado analisado quando comparadas com a cepa de referência *Listeria monocytogenes* EGD-e (Anexo 1), que representaram 8 substituições de aminoácidos (Anexo 2).

Os resultados de alta capacidade de invasão em isolado onde não foi detectado PMSCs estão de acordo com a literatura, que relaciona a presença de PMSCs com cepas

com menor capacidade de invasão celular em função da expressão de *inlA* truncada (OLIER et al., 2005; NIGHTINGALE et al., 2008). Estudos de bioinformática que analisaram a interação entre internalina A e E-caderina mostraram que alterações em resíduos individuais na estrutura da *inlA* foram capazes de alterar a capacidade de interação com seu receptor (SCHUBERT et al., 2002). Desse modo, a alta capacidade de invasão detectada no isolado pode estar associada com alterações conformacionais na proteína secretada que aumente a área de interação internalina A-E-caderina, ou pode estar relacionada com a expressão de outros genes relacionados à capacidade de invasão celular desse microrganismo, como a *inlB*, proteína de invasão relacionada à virulência (*vip*) ou proteína de adesão da *Listeria* (LAP) (LOPES-LUZ et al., 2021), que não foram pesquisados no presente estudo. Mais estudos são necessários para investigar se as alterações nucleotídicas observadas no gene *inlA* analisado são capazes de levar a alterações conformacionais que influenciem na capacidade de invasão do isolado de *L. monocytogenes* analisado.

6.12. Pesquisa de capacidade de formação de biofilme *in vitro* de *Escherichia coli*

Todos os isolados de *E. coli* testados apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, em pelo menos uma das condições testadas. Um isolado (16EC) foi classificado como forte formador de biofilme em todas as condições de tempo e temperatura testadas no presente estudo. Os resultados do teste para avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de *E. coli* encontram-se descritos na Tabela 7.

Nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, 02 dos 07 isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme fraco em praticamente todas

Tabela 7 - Resultados da classificação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* individual de acordo com o protocolo descrito por STEPANOVIĆ et al. (2000) sob 10°C, 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas de incubação, e dos morfotipos detectados pelo teste do Vermelho Congo dos isolados de *Escherichia coli* submetidos às incubações de 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas.

Temperatura			10°C						24°C						37°C					
Tempo		24h		48h		72h		24h		48h		72h		24h		48h		72h		
Isolado	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação	Morfotipo	Classificação		
3-A	-	Moderado	-	Moderado	-	Fraco	SAW	Moderado	SAW	Moderado	PDAR	Moderado	SAW	Moderado	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
5-A	-	Fraco	-	Moderado	-	Moderado	PDAR	Moderado	PDAR	Forte	PDAR	Forte	SAW	Moderado	SAW	Moderado	SAW	Moderado		
16-A	-	Forte	-	Forte	-	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte		
17-A	-	Forte	-	Forte	-	Moderado	SAW	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	SAW	Fraco	PDAR	Moderado	PDAR	Moderado		
138-A	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
139-A	-	Não formador	-	Fraco	-	Fraco	RDAR	Fraco	RDAR	Fraco	RDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
140-A	-	Fraco	-	Moderado	-	Fraco	RDAR	Moderado	RDAR	Moderado	RDAR	Fraco	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	BDAR	Forte		
33-B	-	Moderado	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
36-B	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	SAW	Fraco	SAW	Fraco	SAW	Fraco	SAW	Fraco	BDAR	Fraco	BDAR	Fraco		
37-B	-	Moderado	-	Forte	-	Forte	SAW	Forte	SAW	Forte	BDAR	Forte	SAW	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado		
39-B	-	Fraco	-	Fraco	-	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	BDAR	Forte	SAW	Fraco	BDAR	Forte	BDAR	Moderado		
50-B	-	Fraco	-	Forte	-	Forte	BDAR	Forte	RDAR	Forte	RDAR	Forte	RDAR	Forte	RDAR	Forte	RDAR	Moderado		
67-C	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	SAW	Não formador	SAW	Não formador	SAW	Fraco	SAW	Não formador	SAW	Não formador	SAW	Não formador		
68-C	-	Moderado	-	Forte	-	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	SAW	Forte	BDAR	Moderado	BDAR	Forte		
74-C	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Moderado	PDAR	Moderado	RDAR	Forte	PDAR	Fraco	PDAR	Moderado	RDAR	Moderado		
75-C	-	Fraco	-	Não formador	-	Não formador	SAW	Fraco	SAW	Fraco	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte		
83-C	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	SAW	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
86-C	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Não formador	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Não formador	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco		
88-C	-	Moderado	-	Moderado	-	Fraco	PDAR	Forte	RDAR	Moderado	RDAR	Moderado	BDAR	Fraco	BDAR	Fraco	BDAR	Fraco		
91-C	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Moderado	RDAR	Moderado	RDAR	Moderado	RDAR	Moderado	RDAR	Fraco	RDAR	Fraco		
115-D	-	Forte	-	Forte	-	Forte	SAW	Forte	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	SAW	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado		
116-D	-	Forte	-	Forte	-	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Moderado	BDAR	Forte	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado		
117-D	-	Fraco	-	Não formador	-	Fraco	PDAR	Forte	PDAR	Moderado	PDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado		
119-D	-	Forte	-	Forte	-	Fraco	PDAR	Moderado	RDAR	Moderado	RDAR	Fraco	BDAR	Moderado	BDAR	Fraco	BDAR	Fraco		
122-D	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	SAW	Moderado	SAW	Moderado	SAW	Moderado	SAW	Fraco	SAW	Fraco	SAW	Moderado		
125-D	-	Fraco	-	Fraco	-	Não formador	PDAR	Não formador	RDAR	Fraco	RDAR	Fraco	BDAR	Fraco	BDAR	Não formador	BDAR	Fraco		
130-D	-	Fraco	-	Fraco	-	Moderado	RDAR	Fraco	RDAR	Moderado	RDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado		
131-D	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	BDAR	Fraco	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Fraco	BDAR	Fraco		

134-D	-	Forte	-	Forte	-	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Forte	RDAR	Forte	RDAR	Moderado	RDAR	Forte
136-E	-	Fraco	-	Moderado	-	Moderado	BDAR	Forte	BDAR	Forte	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado	BDAR	Moderado
137-E	-	Fraco	-	Fraco	-	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	PDAR	Fraco	SAW	Moderado	SAW	Fraco	BDAR	Moderado
A- Ambiente de abatedouro de bovinos		B- Ambiente de abatedouro de aves				C- Carcaça suína				D- Ambiente de abatedouro de suíno				E- Alimento de origem animal				

as condições testadas (138EC e 139EC, Tabela 7). Outros 05 isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme moderada ou forte, sendo que o isolado 16EC apresentou capacidade de formação de biofilme forte em todas as condições testadas. Notou-se uma tendência à maior capacidade de formação de biofilme a 24°C, onde 05 dos 07 isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme forte após 72 horas de incubação nessa temperatura (5EC, 16EC e 17EC, Tabela 7).

Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves, 02 dos 05 isolados (33EC e 36EC) mantiveram capacidade de formação de biofilme fraca em todas as condições testadas (Tabela 7). De modo semelhante ao ocorrido nos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de bovinos, houve uma maior quantidade de isolados com capacidade de formação de biofilme forte a 24°C quando comparado com as incubações à 10°C e 37°C, com 72 horas de incubação.

Nos isolados oriundos de carcaças suínas, apenas 01 isolado (68EC) apresentou capacidade forte de formação de biofilme, com 72 horas de incubação nas três temperaturas testadas no presente estudo (Tabela 7). Houve uma tendência maior à capacidade de formação de biofilme moderada a 24°C, quando comparada com as outras duas temperaturas testadas. Os isolados 67EC, 83EC e 88EC mantiveram-se como formadores fracos ou não formadores de biofilme com 72 horas de incubação em todas as temperaturas testadas. O isolado 75EC, por sua vez, foi classificado como não formador e formador fraco de biofilme a 10°C, como formador fraco a moderado a 25°C, e como formador forte a 37°C (Tabela 7).

Com relação aos isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, a condição de incubação a 10°C foi onde detectou-se maior número de isolados com forte capacidade de formação de biofilme, com 03 dos 09 isolados sendo formadores fortes com 72 horas de incubação nessa temperatura (115EC, 116EC e 134EC, Tabela 7). O

isolado 125EC manteve-se como não formador de biofilme ou formador fraco em todas as condições testadas (Tabela 7). Já o isolado 117EC passou de não formador ou formador fraco a 10°C para formador forte ou moderado nas outras condições de temperatura testadas (Tabela 7). O isolado 134EC, por sua vez, manteve-se como forte formador de biofilme em quase todas as condições testadas no presente estudo, sendo classificado como formador de biofilme moderado apenas com 48 horas de incubação a 37°C (Tabela 7).

Os isolados oriundos de alimentos de origem animal foram capazes de formar biofilme em todas as condições testadas. O isolado 136EC, oriundo de amostra de queijo minas tipo padrão, foi classificado como formador de biofilme moderado na maioria das condições testadas, com a exceção da condição de 24°C, na qual o isolado foi classificado como formador forte de biofilme com 24 e 48 horas de incubação (Tabela 7). Já o isolado 137EC, oriundo de amostra de linguiça suína, foi classificado como formador fraco de biofilme em quase todas as condições testadas, exceto com 24 e 48 horas de incubação a 37°C, onde foi classificado como formador de biofilme moderado (Tabela 7).

Os resultados do teste de capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos 31 isolados de *E. coli* analisados indicaram que a temperatura influenciou significativamente a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados ($p=0,0021$). Houve diferença significativa na capacidade de formação de biofilme a 24°C quando comparado com a capacidade de formação de biofilme a 10°C ($p=0,0103$) e 37°C ($p=0,0042$). Não houve diferença significativa na capacidade de formação de biofilme entre as temperaturas de 10°C e 37°C ($p=0,9573$), nem entre os diferentes tempos de incubação. Houve uma maior proporção de isolados com forte capacidade de formação de biofilme na condição de incubação a 24°C, na qual 12 dos 31 isolados (38,7%) apresentaram forte capacidade de formação de biofilme em pelo menos um dos tempos analisados, seguido da condição de

incubação à 10°C, onde 09 dos 31 isolados (29,03%) foram classificados como formadores fortes de biofilme em algum dos tempos analisados, e, por fim, na condição de 37°C, 07 dos 31 isolados foram classificados como forte formadores de biofilme em pelo menos um dos tempos analisados (22,58%) (Tabela 7). Esses resultados eram esperados, uma vez que a temperatura é uma condição ambiental que influencia nos mecanismos de expressão de genes relacionados à passagem do modo planctônico para o modo fixo para desenvolvimento de biofilmes nos microrganismos (MOON et al., 2023), como através da ativação de genes dependentes do fator sigma de resposta ao estresse Rpos (subunidades peptídicas que regulam a transcrição), que são ativados em temperaturas mais baixas quando comparado com incubações a 37°C em *E. coli* (WHITE-ZIEGLER et al., 2008), ou pelo aumento na produção de diguanilato cíclico (c-di-GMP) em baixas temperaturas (TOWNSLEY; YILDIZ, 2015).

Quando comparada a capacidade de formação de biofilme entre isolados oriundos de amostras de ambientes e isolados oriundos de carcaças e alimentos de origem animal, houve uma maior proporção de isolados oriundos de amostras de ambientes de abatedouros classificados como formadores fortes de biofilme, sendo que 61,9% (13 dos 21 isolados oriundos dessas fontes) foram classificados como formadores fortes de biofilme em pelo menos uma das condições testadas no presente estudo, enquanto que, para os isolados oriundos de carcaças suínas e alimentos de origem animal, essa proporção foi de metade dos isolados apresentando forte capacidade de formação de biofilme (5 entre os 10 isolados oriundos dessas fontes). Esses resultados podem estar relacionados com pressões de seleção que levem à disseminação de estirpes mais adaptadas às condições ambientais, presentes nos ambientes de abatedouros de aves, bovinos e suínos, incluindo baixas temperaturas, constantes higienizações, etc.

Houve uma associação significativa entre capacidade de adesão celular em células da linhagem Caco-2 e a capacidade de formação de biofilme ($p < 0,0001$) nos isolados de *E. coli* analisados, indicando que isolados que apresentam maior capacidade de adesão celular tendem a ter maior capacidade de formação de biofilme. Esses resultados podem estar relacionados com a expressão de diversos fatores de superfície celular como adesinas, que contribuem para a capacidade de adesão desses isolados (SANDAÑA et al., 2009; AGEORGES et al., 2020). O isolado 138EC, que apresentou maior capacidade de adesão celular (Figura 7), apresentou capacidade de formação de biofilme fraca em todas as condições testadas no presente estudo. Outros isolados que apresentaram maior capacidade de adesão celular, apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro* classificada como moderada na maioria dos casos, com exceção do isolado 50EC e 134EC, que apresentaram capacidade de adesão celular elevadas e também apresentaram capacidade forte de formação de biofilme a 37°C (Figura 7, Tabela 7). Apesar dessas diferenças, a capacidade forte de formação de biofilme *in vitro* a 37°C observada em 08 dos 31 isolados analisados no presente estudo podem representar um risco à saúde pública, uma vez que isolados capazes de formar biofilme a 37°C, especialmente com forte capacidade para tal, não terão essa capacidade inibida pela temperatura corporal do hospedeiro em uma possível infecção intestinal ou extraintestinal.

Os isolados 88EC e 91EC, que tiveram 100% de homologia na análise filogenética realizada por meio do RAPD, apresentaram diferentes capacidades de formação de biofilme nas condições analisadas no presente estudo. De modo semelhante, os isolados 125EC e 130EC, também homólogos na análise filogenética, apresentaram capacidade de formação de biofilme distintas nas condições testadas no presente estudo. Esses resultados demonstram a presença de variabilidade genética nesses isolados, uma vez que

mesmo isolados com ampla similaridade filogenética apresentam diferenças de expressão genética, mesmo quando expostos às mesmas condições.

Os isolados EHEC detectados neste estudo, 67EC e 83EC, apresentaram capacidade de formação de biofilme semelhantes entre si, sendo classificados como formadores fracos de biofilme em quase todas as condições testadas (Tabela 7). Os isolados EPEC, 37EC e 116EC, de modo semelhante, também apresentaram capacidade de formação de biofilme semelhantes entre si, tendo apresentado capacidade de formação de biofilme forte e moderada nas diferentes condições testadas (Tabela 7). Com relação aos isolados que apresentaram padrão de adesão celular AA, 17EC e 68EC, a capacidade de formação de biofilmes também foi semelhante, sendo classificados como formadores moderados e fortes nas condições testadas no presente estudo (Tabela 7). Os isolados que apresentaram o padrão de adesão DA no cultivo de células Caco-2 apresentaram capacidade de formação de biofilmes variadas, sendo que os isolados com padrão de adesão DA 33EC e 138EC apresentaram capacidade de formação de biofilme fraca em todas, ou quase todas as condições testadas, e o isolado 74EC apresentou capacidade de formação de biofilme desde fraca até forte, a depender da condição de incubação (Tabela 7). Os isolados STEC e os isolados que não foram classificados em nenhum dos patótipos pesquisados nesse estudo, por sua vez, apresentaram ampla variação de capacidade de formação de biofilme, indo desde isolados não formadores de biofilmes em várias condições testadas, como o isolado 125EC, até isolados que mostraram forte capacidade de formação de biofilme em todas ou quase todas as condições testadas, como os isolados 16EC e 134EC (Tabela 7).

Os isolados de *E. coli* que expressaram curli foram significativamente melhores formadores de biofilme ($p=0,0069$). Com relação aos isolados que expressaram celulose, não houve diferença na capacidade de formação de biofilme ($p=0,5919$). Os isolados que

apresentaram o morfotipo SAW no teste do Vermelho Congo (VC), apresentaram capacidades variáveis de formação de biofilme *in vitro*, com a maioria apresentando capacidade fraca de formação de biofilme na maioria das condições testadas, apesar de alguns isolados terem sido classificados como formadores moderados de biofilme em algumas condições, mesmo apresentando ausência de expressão de curli e celulose (Tabela 7). Dois isolados, 37EC e 115EC, apresentaram resultados discrepantes, tendo sido classificados como formadores fortes de biofilme em algumas condições testadas, apesar da observação do morfotipo SAW no teste do VC (Tabela 7). Já com relação ao morfotipo RDAR, não houve associação entre esse morfotipo e maior capacidade de formação de biofilme, uma vez que houve ampla variação na capacidade de formação de biofilme nas condições testadas do estudo, em que foi observado formadores fracos e fortes de biofilme (Tabela 7). Quando comparada a capacidade de formação de biofilme classificada como forte e os diferentes morfotipos detectados no presente estudo, o morfotipo BDAR demonstrou maior correlação com forte capacidade de formação de biofilme quando comparado com os morfotipos RDAR, PDAR e SAW. Forte capacidade de formação de biofilme estava associada ao morfotipo BDAR em 31,94% dos casos (23 associações entre essa capacidade de formação de biofilme e esse morfotipo em 72 observações), enquanto que para o morfotipo RDAR a proporção foi de 16,67% (5/30), para o morfotipo PDAR foi de 6,25% (3/48) e para o morfotipo SAW foi de 8,57% (3/35), indicando que, para os isolados analisados no presente estudo, a expressão de curli isoladamente conferiu maior capacidade de formação de biofilme quando comparado com a não expressão de nenhuma das duas estruturas amiloides analisadas, ou com a expressão apenas de celulose, ou com a expressão das duas estruturas, o que contradiz resultados descritos na literatura, que sugerem que a expressão de ambas as estruturas está relacionada à maior capacidade de formação de biofilme em *E. coli* (SALDAÑA et al.,

2009; TRMCIC et al., 2018). Os resultados observados no presente estudo podem estar relacionados com a expressão de outros mecanismos que confirmam forte capacidade de formação de biofilme a esses microrganismos, independentes da expressão de curli e celulose, como alterações que se relacionem com expressão de fímbrias do tipo I, proteínas autotransportadoras, pilis conjugativos, e outros exopolissacarídeos (MALCOVA et al., 2008; ÖZTÜRK; DARCAN; KARIPTAŞ, 2023), levando à maior capacidade de formação de biofilme mesmo na ausência do morfotipo RDAR.

Os resultados descritos sugerem que os isolados de *E. coli* analisados no presente estudo apresentam ampla variabilidade de capacidade de formação de biofilme nas diferentes condições de tempo e temperatura de incubação testadas. A detecção de isolados que apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro* a 10°C, especialmente isolados oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos, que apresentaram capacidade forte de formação de biofilme *in vitro* nessa temperatura com apenas 24 horas de incubação, são de grande importância para a indústria de produção de alimentos de origem animal, uma vez que trata-se de ambientes constantemente mantidos em temperaturas mais baixas, e a presença de estirpes com alta capacidade de formação de biofilme dentro desses ambientes pode representar importantes desafios dentro dessas indústrias, por terem potencialmente maior capacidade de estabelecer biofilmes nesses ambientes e, com isso, potencialmente representarem pontos de contaminação para os produtos de origem animal.

Os ensaios de capacidade de formação de biofilme *in vitro* realizados no presente estudo detectaram 08 isolados capazes de formar biofilme a 37°C, em pelo menos um dos tempos analisados. Os resultados de caracterização desses isolados estão sumarizados na Tabela 8. Dentre os isolados com forte capacidade de formação de biofilme *in vitro* a 37°C em pelo menos um dos tempos analisados, nota-se a ocorrência de diversos fatores

Tabela 8- Resultados de origem, patotipo, capacidade de formação de biofilme *in vitro* a 37°C, expressão de curli e celulose a 37°C, capacidade de adesão celular e padrão de adesão celular em células Caco-2, detecção de genes de virulência, detecção do gene *ampC*, multirresistência antimicrobiana e detecção fenotípica de produção de ESBLs dos isolados de *Escherichia coli* 16EC, 39EC, 50EC, 68EC, 75EC, 116EC, 134EC e 140EC.

Isolado	Fonte	Patotipo	Biofilme <i>in vitro</i> a 37°	Expressão de curli a 37°C	Expressão de celulose a 37°C	Adesão celular (%)	Padrão de adesão celular	Genes de virulência	<i>ampC</i>	MRA	Produção de ESBL
16EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	-	Forte	X	-	66,24	LA	<i>saa</i>	X	X	X
39EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	Forte	X	-	65,44	LA	<i>stx-1, saa, hlyA</i>	-	X	-
50EC	Ambiente de abatedouro de aves	STEC	Forte	X	X	77,54	LA	<i>stx-1</i>	X	X	X
68EC	Carcaça suína	EAEC/STEC	Forte	X	-	63,27	AA	<i>stx-1, sxt-2, hlyA</i>	X	X	X
75EC	Carcaça suína	STEC	Forte	X	-	64,91	LA	<i>stx-1, tira, hlyA</i>	X	X	-
116EC	Ambiente de abatedouro de suínos	EPEC	Forte	X	-	57,43	LA	<i>eae</i>	-	X	-
134EC	Ambiente de abatedouro de suínos	-	Forte	X	X	73,65	LA	-	X	X	-
140EC	Ambiente de abatedouro de bovinos	STEC	Forte	X	-	70,95	LA	<i>stx-1, saa</i>	X	-	-

X- Característica presente

MRA – multirresistência antimicrobiana

que representam potenciais riscos para a saúde pública, como a presença de genes de virulência e multirresistência antimicrobiana (MRA) em quase todos os isolados em questão e a detecção de produção de ESBLs em 03 desses isolados (Tabela 8). Esses isolados foram oriundos tanto de ambientes de abatedouros quanto de carcaças suínas, o que reflete potencial risco para a população através da possibilidade de contaminação cruzada dos alimentos produzidos nesses locais. Esses resultados são de particular importância, uma vez que fornecem dados sobre estirpes potencialmente patogênicas que, além de representarem importantes reservatórios de genes de virulência e resistência

antimicrobiana dentro desses ambientes, também se mostraram capazes de formar biofilme em temperatura próxima à temperatura corporal humana. Esse resultado, associado à presença de genes de virulência e resistência, fenótipos de resistência antimicrobiana e capacidade de adesão celular, caracterizados no presente estudo, além do potencial risco para a saúde pública, sublinha a importância da vigilância sobre as estirpes circulantes em ambientes de produção de alimentos de origem animal, os quais podem contribuir com dados epidemiológicos para a região.

De maneira geral, os resultados do presente estudo mostraram que os isolados de *E. coli* apresentaram ampla variabilidade nas características genóticas e fenotípicas analisadas. Os isolados oriundos de ambientes de abatedouros bovinos apresentaram ampla variedade de patótipos e padrões de adesão celular, além de diferenças consideráveis na capacidade de adesão celular e capacidade de formação de biofilme *in vitro* (Tabelas 7, 8 e 9, Figura 7). Foi um grupo que apresentou uma alta proporção de isolados produtores de ESBLs, mas com menor número de isolados multirresistentes. Houve uma alta detecção do gene de virulência *saa* e, dentre os genes relacionados à resistência antimicrobiana, os genes *ampC* e *mcr-4* foram mais comumente detectados (Tabelas 2 e 3). A variabilidade genética foi considerável, uma vez que esses isolados foram agrupados em 4 *clusters* distintos na análise filogenética realizada neste estudo (Figura 2). Os isolados oriundos de ambientes de abatedouros de aves apresentaram menor variedade de patótipos e de padrões de adesão celular, apresentando também menor diferença na capacidade de adesão celular (Tabela 6, Figura 7). Os genes de virulência *stx-1* e *saa* foram o mais comumente detectados, enquanto o gene *ampC* foi detectado em quase todos esses isolados (Tabelas 2 e 3). Apesar de nem todos terem produzido ESBLs, a MRA foi observada em todos os isolados oriundos dessa fonte (Tabela 2). De modo semelhante aos isolados oriundos de ambiente de abatedouros de

bovinos, a variabilidade genética nesses 05 isolados observada pela análise de similaridade pelo RADP foi considerável, com isolados pertencentes a 4 *clusteres* distintos (Figura 2). Os isolados oriundos de carcaças suínas foram o que apresentaram maior variedade de patótipos, padrões de adesão celular e capacidade de adesão celular (Tabela 6, Figura 7). Destacou-se nesses isolados a detecção do gene *hlyA* e dos genes *stx-1* e *stx-2*, além do gene *ampC* (Tabelas 2 e 3). A produção de ESBLs foi detectada em isolados oriundos dessa fonte, e a MRA foi observada em todos esses isolados (Tabela 2). Esses isolados apresentaram a menor variabilidade com relação à análise filogenética uma vez que, apesar de estarem distribuídos em 4 *clusteres*, metade dos isolados oriundos dessa fonte se agruparam no mesmo *cluster* (Figura 2). Já nos isolados oriundos de carcaças suínas, notou-se algumas semelhanças com os isolados oriundos de ambientes de abatedouros de suínos, como a detecção de MRA em todos os isolados e a produção de ESBLs em alguns dos isolados (Tabela 2). Porém, os perfis dos genes de virulência e resistência antimicrobiana mostraram a predominância dos genes *stx-1* e genes relacionados à resistência às tetraciclinas nesses isolados, com menor proporção de isolados que apresentaram o gene *ampC* (Tabelas 2 e 3). Por fim, os isolados oriundos de alimentos de origem animal apresentaram capacidades de adesão celular semelhantes, e ambos apresentaram o gene *stx-1*. Porém, o perfil de resistência antimicrobiana fenotípica e de genes de resistência antimicrobiana foi diametralmente oposto, com um isolado sensível a todas as bases antimicrobianas testadas e o outro isolado apresentando MRA (Tabela 2).

Os resultados descritos denotam a ampla heterogeneidade dos isolados de *E. coli* circulantes nos ambientes e alimentos de origem animal na região do Distrito Federal. Essa variabilidade pode decorrer da alta rotação de animais que ocorre nos abatedouros-frigoríficos, que servem como veículos para estirpes de origens distintas que, ao se

estabelecerem nesses ambientes, funcionam como reservatórios de genes de virulência e de resistência, levando ao desenvolvimento de estirpes potencialmente patogênicas e apresentando altas taxas de RA e MRA, como observado nos testes de resistência antimicrobiana realizados no presente estudo. Essa heterogeneidade observada em *E. coli* oriundas de fontes de alimentos e produção de alimentos de origem animal significa um desafio para o estudo dessas estirpes, e também para a saúde pública em função do potencial patogênico apresentado por esses microrganismos.

6.13. Pesquisa de capacidade de formação de biofilme *in vitro* de *Listeria monocytogenes*

O isolado de *L. monocytogenes* analisado foi capaz de formar biofilme *in vitro* em todas as condições de tempo e temperatura testadas, tendo sido classificado como formador fraco de biofilme em todos os tempos analisados a 10°C e até 48 horas de incubação na condição de temperatura de 24°, passando a ser classificado como formador de biofilme moderado a 72 horas nessa temperatura. Na temperatura de 37°C, o isolado em questão foi classificado como forte formador de biofilme após 48 e 72 horas de incubações. Os resultados de classificação de capacidade de formação de biofilme *in vitro* do isolado de *L. monocytogenes* nas diferentes condições testadas estão apresentados na Tabela 9.

Os resultados de detecção de capacidade de formação de biofilme, nas diferentes condições descritas no presente estudo, do isolado de *L. monocytogenes*, estão de acordo com outros estudos que descreveram a capacidade de formação de biofilme *in vitro* desse

Tabela 9 - Resultado da classificação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* de acordo com o protocolo descrito por STEPANOVIĆ et al. (2000), do isolado de *Listeria monocytogenes* submetidos a incubação a 10°C, 24°C e 37°C por 24, 48 e 72 horas.

Temperatura	Tempo	Classificação
10°C	24h	Fraco
	48h	Fraco
	72h	Fraco
24°C	24h	Fraco
	48h	Fraco
	72h	Moderado
37°C	24h	Fraco
	48h	Forte
	72h	Forte

microrganismo oriundo de alimentos prontos para consumo e outras fontes em diferentes condições de temperatura (IN LEE et al., 2017; DAVANZO et al., 2021; RAMIRES et al., 2021). Os resultados de melhor capacidade de formação de biofilme à 37°C quando comparado com condições de incubação em menores temperaturas, porém, vai de encontro com os resultados esperados, uma vez que esse microrganismo apresenta diversos mecanismos de adaptação ao estresse de frio como alterações lipídicas de membrana, expressão de peptídeos crioprotetores e de proteínas relacionadas ao estresse bacteriano (TASARA; STEPHAN, 2006; SANTOS et al., 2019), o que estimula a formação de biofilme a baixas temperaturas e fazem com que esse microrganismo seja um grande desafio na indústria de produção de alimentos de origem animal, cujos ambientes são mantidos sob baixas temperaturas. Os resultados de capacidade de formação de biofilme em temperaturas mais baixas testadas no presente estudo sugerem que se trata de um isolado competente na indução desses fatores de resposta ao estresse de frio. Além disso, os resultados descritos no presente estudo demonstram a capacidade de formação de biofilme em condições diversas de temperatura e tempo de incubação, além da demonstração de capacidade de formação de biofilme a 37°C, temperatura próxima à do corpo humano, indicando que esse isolado possui boa capacidade de se

adaptar a diferentes condições de temperatura, aumentando a possibilidade de estabelecimento de biofilmes nos ambientes e levando à possível persistência e disseminação dessa estirpe. Esses resultados de capacidade de formação de biofilme *in vitro* em todas as condições de temperatura e tempo testados, associados à multirresistência antimicrobiana apresentada e a alta capacidade de adesão e invasão celular apresentadas por esse isolado, que foi oriundo de alimento de origem animal pronto para consumo, indicam tratar-se de um isolado de interesse por seu potencial patogênico, representando assim possível risco para a saúde pública.

7. CONCLUSÕES

A caracterização de estirpes de *E. coli* oriundas de ambientes de abatedouros-frigoríficos de aves, bovinos e suínos, de carcaças suínas e de alimentos de origem animal na região do Distrito Federal evidenciou a ampla heterogeneidade desse microrganismo presente nas fontes analisadas. Foram detectados isolados classificados como STEC, EPEC, EHEC, EAEC e DAEC a partir da pesquisa de genes de virulência e padrões de adesão celular em células Caco-2 nesses isolados, sendo este, até onde foi possível verificar, o primeiro estudo a investigar os padrões de adesão celular em isolados oriundos dessas fontes na região Centro-Oeste do Brasil. Isolados não classificados como pertencentes aos patótipos investigados no presente estudo apresentaram presença de genes de virulência, genes de resistência antimicrobiana, resistência antimicrobiana fenotípica e capacidade de formação de biofilme *in vitro*, expressando potencial como reservatórios de genes de virulência e resistência antimicrobiana e capacidade de adaptação para disseminação nos ambientes através da capacidade de formação de biofilme, significando assim riscos para a saúde pública. O único isolado que não

apresentou nenhum gene de virulência, apresentou fenótipo de MRA e alta capacidade de formação de biofilme a 37°C, com expressão de curli e celulose e morfotipo RDAR em diferentes condições de temperatura e tempo de incubação, demonstrando com isso seu potencial como reservatório de genes de resistência antimicrobiana associado ao potencial para formação de biofilmes dentro da indústria de produção de alimentos.

Foi detectada produção de ESBLs em isolados oriundos de todas as fontes analisadas no presente estudo, exceto nos isolados oriundos de alimentos de origem animal. Esses resultados, associados aos resultados de ampla disseminação de fenótipos de resistência a β -lactâmicos e de detecção do gene *ampC* nos isolados circulantes nesses ambientes e produtos demonstram a circulação de genes que conferem resistência a essa importante classe de antimicrobianos na região do Distrito Federal, sendo esse o primeiro estudo que caracterizou fenotipicamente a presença de ESBLs em isolados oriundos dessas fontes na região do Distrito Federal até onde foi possível verificar, explicitando com isso potenciais riscos à saúde pública associados à RA à β -lactâmicos.

A detecção de MRA em quase todos os isolados analisados no presente estudo, estando ela presente em todas as fontes analisadas, demonstram o risco relacionado à emergência e circulação de estirpes multirresistentes na região, especialmente em ambientes de produção de alimentos de origem animal, que são importantes fontes de contaminação cruzada dos alimentos, significando potencial risco para a saúde pública.

A capacidade de formação de biofilme *in vitro* detectada nos isolados de *E. coli*, com maior proporção de isolados oriundos de amostras de ambientes de abatedouros frigoríficos como formadores fortes de biofilme, quando comparado com isolados oriundos de amostras de carcaças suínas e alimentos de origem animal, sugerem a maior adaptação desses isolados às condições ambientais adversas através da formação de biofilmes. A capacidade de formação de biofilmes a 10°C desses isolados representam

desafios para a indústria de produção de alimentos de origem animal, uma vez que essa capacidade pode levar à manutenção e disseminação dessas estirpes nesses ambientes. Além disso, a capacidade de formação de biofilme a 37°C observada em diversos dos isolados de *E. coli* analisados representa riscos para a saúde pública, uma vez que a expressão dessa capacidade se relaciona com isolados potencialmente patogênicos. A expressão de curli e celulose em diferentes condições de temperatura observadas no presente estudo sugerem a capacidade de adaptação desses isolados em diferentes condições de temperatura, auxiliando na persistência e disseminação dessas estirpes nos ambientes.

A caracterização do isolado de *L. monocytogenes* a partir da pesquisa de resistência antimicrobiana fenotípica, pesquisa de genes de resistência antimicrobiana e pesquisa de capacidade de adesão e invasão celular associada ao sequenciamento do gene *inlA* evidenciaram a ocorrência de um isolado potencialmente patogênico presente em alimento pronto para consumo de origem animal comercializado na região. A detecção de MRA, associada com a alta capacidade de invasão celular e com a capacidade de formação de biofilme *in vitro* descritos neste isolado evidenciam os potenciais riscos à população representados por esse isolado, especialmente considerando grupos de risco. Os resultados de MRA em um isolado com capacidade de formação de biofilme descritos no presente estudo sugerem a circulação de estirpes que podem agir como reservatórios de genes de virulência, e a determinação da capacidade de formação de biofilme desse isolado sugere capacidade de adaptação ambiental, significando riscos para a saúde pública.

A detecção e caracterização de isolados de *E. coli* oriundos de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves, bovinos e suínos, carcaças suínas, e alimentos de origem animal, e a caracterização de *L. monocytogenes* oriunda de alimentos de origem animal,

relacionado à pesquisa de fatores de virulência, resistência antimicrobiana e capacidade de formação de biofilme, são importantes para a vigilância sobre os potenciais riscos aos quais a população consumidora pode estar exposta, oferecendo dados para investigações epidemiológicas de fatores de risco relacionadas à circulação de microrganismos potencialmente patogênicos, e sobre o cenário da RA em estirpes oriundas de fontes relacionadas à cadeia de produção de alimentos de origem animal, e com isso apoiar tomadas de decisão dentro da indústria de produção de alimentos de origem animal para mitigação de riscos em um contexto multifatorial de saúde única.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, Frank Møller et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 353-364, 2000.

AGEORGES, Valentin et al. Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): From bacterial adhesion to biofilm formation. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 3, p. 314-350, 2020.

AGUINIS, Herman; GOTTFREDSON, Ryan K.; JOO, Harry. Best-practice recommendations for defining, identifying, and handling outliers. **Organizational research methods**, v. 16, n. 2, p. 270-301, 2013.

ALONSO, C. A. et al. Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. **Veterinary Microbiology**, v. 207, p. 69–73, 2017.

ALONSO, V. P. P. et al. Dry surface biofilms in the food processing industry: An overview on surface characteristics, adhesion and biofilm formation, detection of biofilms, and dry sanitization methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 1, p. 688–713, 2023.

AMÉZQUITA-MONTES, Z. et al. Genetic relatedness among *Escherichia Coli* pathotypes isolated from food products for human consumption in Cartagena, Colombia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 454–461, 2015.

AMINOV, R. I. et al. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1786–1793, 2002.

ANDRADE, Rafael Rocha de et al. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, v. 44, p. 147-152, 2014.

BIAN, Z. et al. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 602–612, 2000.

BIELASZEWSKA, Martina et al. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in Escherichia coli isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 9, p. 1160-1167, 2006.

BISCHOFF, K. M. et al. The chloramphenicol resistance gene cmlA is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine Escherichia coli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 285–291, 2005.

BOERLIN, Patrick et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.

BORGES, Karen A. et al. Biofilm formation capacity of Salmonella serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 01, p. 71-76, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 out. 2002. Disponível em: https://www.gov.br/servidor/pt-br/siass/centrais_conteudo/manuais/resolucao-rdc-anvisa-n-275-de-21-de-outubro-de-2002.pdf/view. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos para uso veterinário e na alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2003. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-9-de-27-de-junho-de-2003.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 9, de 8 de abril de 2009. Institui procedimentos de controle da Listeria monocytogenes em produtos de origem animal prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 abr. 2009a. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/in_09_de_8_de_abril_de_2009.pdf. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jul. 2009b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-integrado-de-vigilancia-e-controle-de-doencas-transmitidas-por-alimentos.pdf/view>. Acesso em: 07 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proíbe a importação e fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. 2016. Disponível em: https://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/2489_GED.pdf. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa

Agropecuária. Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2018. Disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/dipoa_baselegal/in_60-2018_ecoli_e_salmonella_pncp_su%C3%ADnos_bovinos.pdf. Acesso em: 07 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2019. Disponível em: https://cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-51_191219.pdf. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 6 jul. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em: 04 abr. 2025.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2024a. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024/view>. Acesso em: 07 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN nº 313, de 4 de setembro de 2024b. Altera a Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022, que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 set. 2024. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-313-de-4-de-setembro-de-2024-582631446>. Acesso em: 7 abr. 2025.

BRAZ, Vania Santos; MELCHIOR, Karine; MOREIRA, Cristiano Gallina. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 548492, 2020.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Tabelas de pontos de corte clínicos. Brasília: **BrCAST**, 2025. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Acesso em: 07 abr. 2025.

BrCASTVET. **Métodos para detecção de resistência bacteriana**, 2022. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/08/METODOS-FENOTIPICOS-PARA-DETECCAO-RESISTENCIA-BACTERIANA.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2025.

BRISOLA, M. C. et al. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 647, p. 362–368, 2019.

BRUNDER, Werner et al. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. **Microbiology**, v. 145, n. 5, p. 1005-1014, 1999.

BRUNDER, Werner; SCHMIDT, Herbert; KARCH, Helge. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 4, p. 767-778, 1997.

CALLAWAY, T. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology**, v. 3, n. 1, p. 39–69, 2013.

CAMARGO, Anderson Carlos et al. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil. **Microbial drug resistance**, v. 21, n. 4, p. 458-462, 2015.

CANTARELLI, V. et al. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. **Brazilian Journal of**

Microbiology, v. 31, n. 4, p. 266–270, 2000.

CARATTOLI, Alessandra et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 31, p. 30589, 2017.

CASELLA, Tiago et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3293–3297, 2018.

CASTANHEIRA, M.; SIMNER, P. J.; BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, 2021.

CASTRO, V. S. et al. Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in Brazil: A systematic review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.

CAVALCANTI, A. A. C. et al. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: A systematic literature review and meta-analysis. **Research in Veterinary Science**, v. 145, n. February, p. 169–176, 2022.

CHARPENTIER, Emmanuelle; COURVALIN, Patrice. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2103–2108, 1999.

CHINA, B. et al. Comparison of eae, tir, espA and espB genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 1, p. 177–182, 1999.

CHINA, Bernard; PIRSON, Vinciane; MAINIL, Jacques. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462–3465, 1996.

CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.

CIMDINS, Annika; SIMM, Roger. Semiquantitative analysis of the red, dry, and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* using Congo red. **c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols**, p. 225–241, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-ED35:2025 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition. 2025.

COELHO, M. M. S. et al. *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae Counts, Virulence Gene Profile, Antimicrobial Resistance, and Biofilm Formation Capacity during Pig Slaughter Stages. **Life**, v. 14, n. 10, 2024.

COPPA, Giovanni V. et al. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella* *typhi*. **Pediatric research**, v. 59, n. 3, p. 377–382, 2006.

COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

DA SILVA, Flávio Barbosa et al. Occurrence of ESBL-producing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates in spiced chicken meat in Goiás, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 2, 2023.

DANIEL, Wayne W. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. 10th ed. New York: **Wiley**, 2013.

- DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Infection and immunity**, v. 58, n. 4, p. 893-902, 1990.
- DAVANZO, E. F. A. et al. Molecular characterization of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the federal District and State of Goiás, Brazil. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11 November, p. 1–25, 2021.
- DE ASSIS, D. C. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine meat and meat products over the last 15 years in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Meat Science**, v. 173, n. November 2020, 2021.
- DE MELO TAVARES, R. et al. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from different cattle production systems in Brazil. **Food Microbiology**, v. 121, n. December 2023, p. 104508, 2024.
- DEBENEDICTIS, E. P.; MA, D.; KETEN, Sinan. Structural predictions for curli amyloid fibril subunits CsgA and CsgB. **RSC advances**, v. 7, n. 76, p. 48102-48112, 2017.
- DENAMUR, Erick et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021.
- DISSON, Olivier; MOURA, Alexandra; LECUIT, Marc. Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Trends in microbiology**, v. 29, n. 9, p. 811-822, 2021.
- DJORDJEVIC, S. P. et al. Genomic surveillance for antimicrobial resistance — a One Health perspective. **Nature Reviews Genetics**, v. 25, n. 2, p. 142–157, 2024.
- DOBRINDT, Ulrich. (Patho-) genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 357-371, 2005.
- DONNENBERG, Michael S. et al. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 3, p. 1418-1424, 1993.
- DOS SANTOS, R. L. et al. Molecular characterization and biofilm-formation analysis of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* isolated from Brazilian swine slaughterhouses. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9 September, p. 1–23, 2022.
- DOUMITH, M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819–22, ago. 2004.
- DUAN, X. Y. et al. Progress in Pretreatment and Analysis of Cephalosporins: An Update Since 2005. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 55–86, 2021.
- EFSA; ECDC. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. Parma: **EFSA/ECDC**, 2023. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>. Acesso em: 07 abr. 2025.
- EFSA; ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022. **EFSA Journal**, v. 22, n. 2, p. 1–195, 2024. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/8583>. Acesso em: 07 abr. 2025.
- ESSENDIOUBI, S. et al. Prevalence and Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Pork Carcasses and in Swine Colon Contents from Provincially Licensed Abattoirs in Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 11, p. 1909–1917, 2020.
- ESTADOS UNIDOS. Food Safety and Inspection Service. Code of Federal Regulations, Title 9 – Animals and Animal Products. § 430.4 - Control of *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat products. Washington, D.C.: U.S. **Government Publishing Office**, 2025.

Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-9/chapter-III/subchapter-E/part-430/section-430.4>. Acesso em: 7 abr. 2025.

EVANS, Margery L.; CHAPMAN, Matthew R. Curli biogenesis: order out of disorder. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1551-1558, 2014.

FALÀ, A. Kate et al. Quorum sensing in human gut and food microbiomes: Significance and potential for therapeutic targeting. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1002185, 2022.

FAO. Food and Agriculture Organization for the United Nations, World Health Organization, Codex Alimentarius. Foodborne antimicrobial resistance – Compendium of Codex standards. First revision. **Codex Alimentarius Commission**. Rome, 2023b. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/ebcf2f59-ce5e-4974-ba2d-cb8ae65aa8af/content>. Acesso em: 07 abr. 2025.

FAO. Food and Agriculture Organization for the United Nations. Foodborne antimicrobial resistance (AMR): an economic concern. Roma: **FAO**, 2023a. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/1b8dd4ac-3c28-469c-9c52-8e490e87484e/content>. Acesso em: 07 abr. 2025.

FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. **Codex Alimentarius**, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2025.

FERREIRA, Joseane Cristina et al. Diversity of plasmids harboring bla_{CMY-2} in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 361-364, 2017.

FIROOZEH, Farzaneh et al. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 219-222, 2014.

FLEMMING, H. C. et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 70–86, 2023.

FREIRE, Claudia A. et al. Adhesin related genes as potential markers for the enteroaggregative *Escherichia coli* category. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 997208, 2022.

FREITAS FILHO, E. G. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157: H7 from healthy dairy cattle in Mid-West Brazil: Occurrence and molecular characterization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 24–28, 2014.

FRIEDRICH, Alexander W. et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 1, p. 74-84, 2002.

FUGA, B. et al. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2022.

GAILLARD, JEAN-LOUIS et al. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infection and immunity**, v. 55, n. 11, p. 2822-2829, 1987.

GALIÉ, Serena et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 898, 2018.

- 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, n. January, p. 1–11, 2021.
- GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866–875, 2010.
- GROSSMAN, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 4, p. 1–24, 2016.
- GUALDI, Luciana et al. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 2017–2024, 2008.
- GUO, C. H. et al. High prevalence and transmission of bla_{NDM}-positive *Escherichia coli* between farmed ducks and slaughtered meats: An increasing threat to food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 424, n. February, p. 110850, 2024.
- HAERI, Ali et al. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. **Annals of microbiology**, v. 62, p. 339–344, 2012.
- HAMMAR, M. et al. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 661–670, 1995.
- HARRIS, P. N. A.; FERGUSON, J. K. Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: What are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 297–305, 2012.
- HERAS, Jónathan et al. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC bioinformatics**, v. 16, p. 1–8, 2015.
- HONISH, L. et al. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Contaminated Pork Products. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 6, n. 52, p. 1477–1482, 2017.
- HORNISH, R.; KATARSKI, S. Cephalosporins in Veterinary Medicine - Ceftiofur Use in Food Animals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 717–731, 2005.
- HU, Lan et al. Analysis of the cellulose synthase operon genes, bcsA, bcsB, and bcsC in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell–cell aggregation. **Food Microbiology**, v. 52, p. 97–105, 2015.
- HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 5, p. 2528–2532, 1989.
- HUFNAGEL, D. A.; TÜKEL, Ç.; CHAPMAN, M. R. Disease to Dirt: The Biology of Microbial Amyloids. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 9–12, 2013.
- HUSNA, Asmaul et al. Extended-spectrum β -lactamases (ESBL): challenges and opportunities. **Biomedicines**, v. 11, n. 11, p. 2937, 2023.
- IGLESIAS, Mariana A. et al. Genetic profiles and invasion ability of *Listeria monocytogenes* isolated from bovine carcasses in Southern Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 4, p. 591–596, 2022.
- IN LEE, S. H. et al. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, v. 91, p. 88–91, 2017.
- JAMALI, Hossein; KRYLOVA, Kateryna; AİDER, Mohammed. Identification and frequency of the associated genes with virulence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from cow's milk presenting mastitis pathology. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 12, p. 1701–1706,

2018.

JESSER, Kelsey J.; LEVY, Karen. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Current opinion in infectious diseases**, v. 33, n. 5, p. 372-380, 2020.

KANKI, Masashi et al. Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 18-22, 2015.

KÉROUANTON, Annaëlle et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 134-137, 2010.

KIKUCHI, Tatsuya et al. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. **Microbiology and immunology**, v. 49, n. 9, p. 875-884, 2005.

KOOPMANS, M. M. et al. Human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, 2022.

KUHNERT, Peter; BOERLIN, Patrick; FREY, Joachim. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

KUSHWAHA, Kalpana; MURIANA, Peter M. Comparison of invasiveness among surface-adherent variants of *Listeria monocytogenes* in Caco-2 cell culture assays. **International journal of food microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 166-171, 2010.

LASARRE, B.; FEDERLE, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 73–111, 2013.

LECUIT, Marc et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**, v. 292, n. 5522, p. 1722-1725, 2001.

LEE, K. et al. Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 8, p. 1557–1566, 2017.

LI, Lili et al. Biofilm formation and quorum sensing of foodborne microorganism. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1107603, 2022a.

LIMA, C. M. et al. Antimicrobial resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* from ready-to-eat foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3612–3619, 2017.

LIMOLI, Dominique H.; JONES, Christopher J.; WOZNIAK, Daniel J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. **Microbial Biofilms**, p. 223-247, 2015.

LIU, X. et al. Persistence of *Listeria monocytogenes* ST5 in Ready-to-Eat Food Processing Environment. **Foods**, v. 11, n. 17, p. 1–12, 2022.

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LOPES-LUZ, L. et al. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 647–666, 2021.

LU, Yang et al. Quorum sensing N-acyl homoserine lactones-SdiA suppresses *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* conjugation through inhibiting traI expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 7, 2017.

- MA, Y. et al. The intrinsic macrolide resistome of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 68, n. 8, 2024.
- MAIA, Darla Silveira Volcan et al. *Listeria monocytogenes* in sliced cheese and ham from retail markets in southern Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 22, p. fnz249, 2019.
- MALCOVA, M. et al. Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. **Veterinary microbiology**, v. 129, p. 1360–366, 2008
- MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.
- MARIALOUIS, X. A.; SANTHANAM, A. Antibiotic resistance, RAPD-PCR typing of multiple drug resistant strains of *Escherichia coli* from Urinary Tract Infection (UTI). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. DC05–DC09, 2016.
- MASEDA, E.; DE LA RICA, A. S. Controversies in the management of ESBL-producing Enterobacterales. Clinical Implications. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 35, p. 41–45, 2022.
- MASLIKOWSKA, J. A. et al. Impact of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* species on outcome and hospitalization costs. **Journal of Hospital Infection**, v. 92, n. 1, p. 33–41, 2016.
- MCLAUCHLIN, James. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, p. 210–213, 1990.
- MEDEIROS, M. et al. Assessment of Internalin A Gene Sequences and Cell Adhesion and Invasion Capacity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Foods of Animal and Related Origins. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n. 4, p. 243–252, 18 dez. 2021.
- MENCK-COSTA, M. F. et al. Resistance and Virulence Surveillance in *Escherichia coli* Isolated from Commercial Meat Samples: A One Health Approach. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, p. 1–14, 2023.
- MENDONÇA, Karla Sequeira et al. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 171–177, 2012.
- MEVO, S. I. U. et al. Promising strategies to control persistent enemies: Some new technologies to combat biofilm in the food industry—A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 6, p. 5938–5964, 2021.
- MEZA-SEGURA, M. et al. New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. October, 2020.
- MONFARDINI, M. V. et al. Transposon mutagenesis of atypical enteroaggregative *Escherichia coli* reveals a hemagglutinin-associated protein that mediates cell adhesion and contributes to the *Galleria mellonella* virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. June, p. 1–8, 2023.
- MONTEIRO, Lilyan Rosmery Luizaga de et al. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* isolada de produtos de origem animal em uma cidade da região Norte do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1443–1448, 2013.
- MORONI, Olivier et al. Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. **Applied and**

environmental microbiology, v. 72, n. 11, p. 6894-6901, 2006.

MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NASTASIJEVIĆ, I.; MITROVIĆ, R.; JANKOVIĆ, V. STEC in the beef chain: One health approach. **Tehnologija mesa**, v. 55, n. 2, p. 93–116, 2014.

NATARAJAN, Mailan et al. A study of virulence and antimicrobial resistance pattern in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal stool specimens from children and adults in a tertiary hospital, Puducherry, India. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 37, p. 1-11, 2018.

NATARO, James P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NAVAB-DANESHMAND, Tala et al. *Escherichia coli* contamination across multiple environmental compartments (soil, hands, drinking water, and handwashing water) in urban Harare: correlations and risk factors. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 3, p. 803, 2018.

NDEGWA, E. et al. Shiga Toxin Subtypes, Serogroups, Phylogroups, RAPD Genotypic Diversity, and Select Virulence Markers of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains from Goats in Mid-Atlantic US. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1–17, 2022.

NICOLAU, Anca Ioana; BOLOCAN, Andrei Sorin. Sampling the processing environment for *Listeria*. **Listeria monocytogenes: Methods and Protocols**, p. 3-14, 2014.

NIGHTINGALE, K. K. et al. *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6570-6583, 2008.

NIGHTINGALE, K. K. et al. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8764-8772, 2005.

OLIER, Mäiwenn et al. Truncated internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* carriage: in vivo investigation by allelic exchange. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 644-648, 2005.

OLIVEIRA JUNIOR, Valtemir Paula de et al. Foodborne disease in Brazil from 2015 to 2021: An exploratory study. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023.

OLSÉN, Arne et al. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 944-949, 1998.

OLSÉN, Arne et al. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 523-536, 1993.

ORSI, R. H.; BAKKER, H. C. de.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 2, p. 79–96, fev. 2011.

OXARAN, Virginie et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v. 68, p. 16-23, 2017.

ÖZTÜRK, F. Y.; DARCAN, C.; KARIPTAŞ, E. The Determination, Monitoring, Molecular

- Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 259–277, 2023.
- PALMA, Joana M. et al. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 957-964, 2016.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, 2005.
- PATON, A. W. et al. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999–7009, 2001.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 271–274, 2002.
- PATON, Adrienne W.; PATON, James C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx 1, stx 2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.
- PATON, Adrienne W.; PATON, James C. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3362-3365, 1999.
- PAWAR, D. M.; ROSSMAN, M. L.; CHEN, J. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 2, p. 418-425, 2005.
- PELAYO, Jacinta Saez et al. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41-49, 1999.
- PEREIRA, A. L. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: Positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 3, p. 366–374, 2007.
- PEREIRA, Alex L.; GIUGLIANO, Loreny G. Adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli* and inhibition by glycoconjugates engaged in the mucosal innate immunity. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 810-831, 2013.
- PERSSON, Søren et al. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2020-2024, 2007.
- PIFFARETTI, J. C. et al. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 10, p. 3818–3822, 1989.
- PINHEIRO, João Juliano et al. Correction to: Occurrence of genes associated with virulence in *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses at different stages of processing at a slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2565, 2021.
- PIRES, Sara M. et al. Burden of foodborne diseases: think global, act local. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 152-159, 2021.
- POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.
- PONTELLO, Mirella et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 48, p. 146-150, 2012.

- POYART, Claire; TRIEU-CUOT, Patrick; BERCHE, Patrick. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 173-180, 1996.
- PULINGAM, Thiruchelvi et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.
- RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.
- RAMIRES, T. et al. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. **Food Research International**, v. 140, 2021
- RATHER, Muzamil A. et al. Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 380-395, 2021.
- RAVINDHIRAN, Ramya et al. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 4, p. 2231-2251, 2023.
- REICHHARDT, C. et al. Congo red interactions with curli-producing *E. coli* and native curli amyloid fibers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–10, 2015.
- RILEY, L. W. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 8, n. 4, p. 1–23, 2020.
- RODRIGUES, Carla Susana; DE SÁ, Claudia Valeria Gonçalves Cordeiro; DE MELO, Cristiano Barros. *Listeria monocytogenes* contamination in industrial sausages. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, n. 1, p. e009118-e009118, 2018.
- RÖMLING, Ute; GALPERIN, Michael Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 9, p. 545-557, 2015.
- ROSARIO, Anisio ILS et al. Shiga toxin–producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products from Bahia, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6535-6547, 2021.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, A. N. D. M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria positive control. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.
- ROSSETTI, Lia; GIRAFFA, Giorgio. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiological methods**, v. 63, n. 2, p. 135-144, 2005.
- ROSSI, E. et al. “It’s a gut feeling”—*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 1–30, 2018.
- ROTH, N. et al. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. **Poultry Science**, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, 2019.
- RUMBAUGH, Kendra P.; SAUER, Karin. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.
- RYSER, E.T.; DONELLY, C.W. 35. *Listeria*. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association. 2013.
- SALDAÑA, Zeus et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 4, p. 992-1006, 2009.

- SAMPAIO, A. N. da C. E. et al. Escherichia coli Occurrence and Antimicrobial Resistance in a Swine Slaughtering Process. **Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 1–11, 2024.
- SAMPAIO, Suely CF et al. Flagellar cap protein FliD mediates adherence of atypical enteropathogenic Escherichia coli to enterocyte microvilli. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 4, p. 1112–1122, 2016.
- SANTIAGO, G. S. et al. Extended-spectrum AmpC–producing Escherichia coli from milk and feces in dairy farms in Brazil. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 9, p. 7808–7811, 2018.
- SANTOS, E. C. C. Dos et al. Escherichia coli O26 and O113:H21 on Carcasses and Beef from a Slaughterhouse Located in Mato Grosso, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 10, p. 653–659, 2018.
- SANTOS, T. et al. Listeria monocytogenes biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. June, p. 1–16, 2019.
- SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, v. 2, n. 7, p. 347–353, 2007.
- SAUER, Karin et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.
- SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, LUIZ R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.
- SCHEUTZ, F. et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing escherichia coli o104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, may to june 2011.
- SCHLECH III, Walter F. Epidemiology and clinical manifestations of Listeria monocytogenes infection. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. gpp3-0014-2018, 2019.
- SCHUBERT, W. D. et al. Structure of internalin, a major invasion protein of Listeria monocytogenes, in complex with its human receptor E-cadherin. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 825–836, 2002.
- SCHÜROFF, P. A.; ANDRADE, F. B.; PELAYO, J. S. Virulence markers, adhesion and biofilm formation of Escherichia coli strains isolated from drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 20, n. 9, p. 1416–1424, 2022.
- SCHWARTZ, Thomas et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS microbiology ecology**, v. 43, n. 3, p. 325–335, 2003.
- SCHWARZ, S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519–542, 2004.
- SERENO, M. J. et al. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent Listeria monocytogenes in a pig slaughterhouse in Brazil. **Food Microbiology**, v. 84, p. 103234, 1 dez. 2019.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering Escherichia coli expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 823–869, 2014.
- SHARMA, S. et al. Multidrug resistance crisis during COVID-19 pandemic : Role of antimicrobial peptides as next-generation therapeutics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, n. 112303, 2022.

- SILVA, N. da et al. Contagem de coliformes totais, conliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. In: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed.. Blucher, 2017b. p. 117–137.
- SILVA, N. da et al. Preparação de amostras para análise. In: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed.. Blucher, 2017a. p. 15–22
- SILVA-DE-JESUS, Ana Carolina et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: The role in disseminating antimicrobial resistance over the meat chain. **Microbiology**, v. 168, n. 10, p. 001245, 2022.
- SIMM, Roger et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1123-1134, 2004.
- SMITH, D. R. et al. The production of curli amyloid fibers is deeply integrated into the biology of *Escherichia coli*. **Biomolecules**, v. 7, n. 4, 2017.
- SONCINI, J. G. M. et al. Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in southern Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2022.
- SOUSA, D. L. C. de et al. Pooled prevalence of *Escherichia coli* phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles in poultry: systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 693–707, 2024.
- STANFORD, K. et al. Biofilm-forming capacity of *Escherichia coli* isolated from cattle and beef packing plants: Relation to virulence attributes, stage of processing, antimicrobial interventions, and heat tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 23, p. 1–13, 2021.
- STEFANŃSKA, I. et al. RAPD-PCR-Based Fingerprinting Method as a Tool for Epidemiological Analysis of *Trueperella pyogenes* Infections. **Pathogens**, v. 11, n. 5, 2022.
- STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- SU, Xudong et al. Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. **Gut Pathogens**, v. 11, p. 1-10, 2019.
- SUTCLIFFE, Joyce et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2562-2566, 1996.
- SWAMINATHAN, Bala; GERNER-SMIDT, Peter. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, v. 80, n. June, p. 1–11, 2023.
- TANWAR, J. et al. Multidrug resistance: An emerging crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, 2014.
- TASARA, T.; STEPHAN, R. Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms and Food Safety Implications. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 6, p. 1473–1484, 2006.
- TEIXEIRA, Larrayane AC et al. *Listeria monocytogenes* in export-approved beef from Mato Grosso, Brazil: prevalence, molecular characterization and resistance to antibiotics and disinfectants. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 18, 2019.
- TENAILLON, Olivier et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

- TOLKER-NIELSEN, Tim. Biofilm development. **Microbial Biofilms**, p. 51-66, 2015.
- TOMA, C. et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.
- TOWNSLEY, L.; YILDIZ, F. H. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4290–4305, 2015.
- TRMCIC, Aljosa et al. Biofilm-forming capacity of five *Salmonella* strains and their fate on postharvest mini cucumbers. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 11, p. 1871-1879, 2018.
- VAN, Thi Thu Hao et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International journal of food microbiology**, v. 124, n. 3, p. 217-223, 2008.
- VENKATESAN, M. et al. Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 2023.
- VIEIRA, Melissa A. et al. Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 6, p. 940-951, 2019.
- WACHINO, Jun-Ichi; DOI, Yohei; ARAKAWA, Yoshichika. Aminoglycoside resistance: updates with a focus on acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics**, v. 34, n. 4, p. 887-902, 2020.
- WANG, Gehua; CLARK, Clifford G.; RODGERS, Frank G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157: H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3613-3619, 2002.
- WANG, Yingsong; BIAN, Zeran; WANG, Yan. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 19, p. 6365-6381, 2022.
- WARD, T. J. et al. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7629–7642, 2008.
- WHITE, A. P. et al. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3219–3227, 2006.
- WHITE-ZIEGLER, C. A. et al. Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 148–166, 2008.
- WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: **WHO**, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565165>. Acesso em: 07 abr. 2025.
- WHO. Integrated surveillance of antimicrobial resistance in foodborne bacteria: application of a One Health approach: guidance from the WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). Geneva: **WHO**, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512411>. Acesso em: 07 abr. 2025.
- WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. Microbiological Risk Assessment Series, n. 31. Geneva: **WHO**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514279>. Acesso em: 7 abr. 2025.
- WHO. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022.

Genebra: **WHO**, 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. Acesso em: 07 abr. 2025.

WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring – Meeting report. Roma: **FAO/WHO**, 2022b. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/items/dd2b7422-421f-4c20-b6e2-0d0fd65652b9>. Acesso em: 07 abr. 2025.

XAVIER, Britto B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Eurosurveillance: European communicable disease bulletin/European Communities. Commission; Communautés européennes. Commission.-Saint-Maurice, 1995, currens**, v. 21, n. 27, p. 30280, 2016.

YANG, X.; TRAN, F.; ZHANG, P. Comparative Genomic Analyses of *Escherichia coli* from a Meat Processing Environment in Relation to Their Biofilm Formation and Persistence. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, 2023.

YIN, Wenjuan et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **MBio**, v. 8, n. 3, p. 10.1128/mbio.00543-17, 2017.

YUAN, Lei et al. Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 10, p. 1651-1660, 2018.

ZHOU, Feng et al. Control measurements of *Escherichia coli* biofilm: A review. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2469, 2022.

Anexo I – Resultados das análises estatísticas realizadas no software SAS® para comparação entre capacidade de formação de biofilme e temperatura, tempo de incubação, expressão de curli e celulose e capacidade de adesão em células da linhagem Caco-2.

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.EMI1
Dependent Variable	OD
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Temp	3	10 24 37
Hora	3	24 48 72

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	16
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs per Subject	279

Number of Observations	
Number of Observations Read	279
Number of Observations Used	279
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates	
Cov Parm	Estimate
Residual	0.05237

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	0.8
AIC (Smaller is Better)	2.8
AICC (Smaller is Better)	2.8
BIC (Smaller is Better)	6.4

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Temp	2	270	6.32	0.0021
Hora	2	270	0.84	0.4345

Temp*Hora	4	270	0.56	0.6891
-----------	---	-----	------	--------

Least Squares Means							
Effect	Temp	Hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Temp	10		0.1485	0.02373	270	6.26	<.0001
Temp	24		0.2468	0.02373	270	10.40	<.0001
Temp	37		0.1390	0.02373	270	5.86	<.0001
Hora		24	0.1593	0.02373	270	6.71	<.0001
Hora		48	0.1732	0.02373	270	7.30	<.0001
Hora		72	0.2018	0.02373	270	8.51	<.0001
Temp*Hora	10	24	0.1125	0.04110	270	2.74	0.0066
Temp*Hora	10	48	0.1606	0.04110	270	3.91	0.0001
Temp*Hora	10	72	0.1724	0.04110	270	4.19	<.0001
Temp*Hora	24	24	0.2155	0.04110	270	5.24	<.0001
Temp*Hora	24	48	0.2239	0.04110	270	5.45	<.0001
Temp*Hora	24	72	0.3010	0.04110	270	7.32	<.0001
Temp*Hora	37	24	0.1498	0.04110	270	3.65	0.0003
Temp*Hora	37	48	0.1352	0.04110	270	3.29	0.0011
Temp*Hora	37	72	0.1321	0.04110	270	3.21	0.0015

Differences of Least Squares Means											
Effect	Temp	Hora	_Temp	_Hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adjustment	Adj P
Temp	10		24		-0.09829	0.03356	270	-2.93	0.0037	Tukey	0.0103
Temp	10		37		0.009446	0.03356	270	0.28	0.7786	Tukey	0.9573
Temp	24		37		0.1077	0.03356	270	3.21	0.0015	Tukey	0.0042
Hora		24		48	-0.01398	0.03356	270	-0.42	0.6774	Tukey	0.9089
Hora		24		72	-0.04257	0.03356	270	-1.27	0.2057	Tukey	0.4143
Hora		48		72	-0.02859	0.03356	270	-0.85	0.3950	Tukey	0.6710
Temp*Hora	10	24	10	48	-0.04810	0.05812	270	-0.83	0.4086	Tukey	0.9960
Temp*Hora	10	24	10	72	-0.05990	0.05812	270	-1.03	0.3037	Tukey	0.9826
Temp*Hora	10	24	24	24	-0.1030	0.05812	270	-1.77	0.0776	Tukey	0.7010
Temp*Hora	10	24	24	48	-0.1114	0.05812	270	-1.92	0.0563	Tukey	0.6027
Temp*Hora	10	24	24	72	-0.1885	0.05812	270	-3.24	0.0013	Tukey	0.0355
Temp*Hora	10	24	37	24	-0.03734	0.05812	270	-0.64	0.5212	Tukey	0.9993
Temp*Hora	10	24	37	48	-0.02271	0.05812	270	-0.39	0.6963	Tukey	1.0000
Temp*Hora	10	24	37	72	-0.01962	0.05812	270	-0.34	0.7360	Tukey	1.0000
Temp*Hora	10	48	10	72	-0.01180	0.05812	270	-0.20	0.8393	Tukey	1.0000
Temp*Hora	10	48	24	24	-0.05486	0.05812	270	-0.94	0.3461	Tukey	0.9902
Temp*Hora	10	48	24	48	-0.06331	0.05812	270	-1.09	0.2770	Tukey	0.9754
Temp*Hora	10	48	24	72	-0.1404	0.05812	270	-2.42	0.0164	Tukey	0.2799
Temp*Hora	10	48	37	24	0.01077	0.05812	270	0.19	0.8532	Tukey	1.0000

Temp*Hora	10	48	37	48	0.02539	0.05812	270	0.44	0.8626	Tukey	1.0000
Temp*Hora	10	48	37	72	0.02849	0.05812	270	0.49	0.8245	Tukey	0.9999
Temp*Hora	10	72	24	24	-0.04307	0.05812	270	-0.74	0.4594	Tukey	0.9981
Temp*Hora	10	72	24	48	-0.05151	0.05812	270	-0.89	0.3763	Tukey	0.9935
Temp*Hora	10	72	24	72	-0.1286	0.05812	270	-2.21	0.0278	Tukey	0.4006
Temp*Hora	10	72	37	24	0.02256	0.05812	270	0.39	0.6982	Tukey	1.0000
Temp*Hora	10	72	37	48	0.03718	0.05812	270	0.64	0.5229	Tukey	0.9994
Temp*Hora	10	72	37	72	0.04028	0.05812	270	0.69	0.4889	Tukey	0.9988
Temp*Hora	24	24	24	48	-0.00845	0.05812	270	-0.15	0.8846	Tukey	1.0000
Temp*Hora	24	24	24	72	-0.08553	0.05812	270	-1.47	0.1423	Tukey	0.8678
Temp*Hora	24	24	37	24	0.06563	0.05812	270	1.13	0.2598	Tukey	0.9694
Temp*Hora	24	24	37	48	0.08025	0.05812	270	1.38	0.1685	Tukey	0.9043
Temp*Hora	24	24	37	72	0.08335	0.05812	270	1.43	0.1527	Tukey	0.8838
Temp*Hora	24	48	24	72	-0.07708	0.05812	270	-1.33	0.1859	Tukey	0.9228
Temp*Hora	24	48	37	24	0.07408	0.05812	270	1.27	0.2036	Tukey	0.9380
Temp*Hora	24	48	37	48	0.08870	0.05812	270	1.53	0.1282	Tukey	0.8425
Temp*Hora	24	48	37	72	0.09180	0.05812	270	1.58	0.1154	Tukey	0.8154
Temp*Hora	24	72	37	24	0.1512	0.05812	270	2.60	0.0098	Tukey	0.1912
Temp*Hora	24	72	37	48	0.1658	0.05812	270	2.85	0.0047	Tukey	0.1055
Temp*Hora	24	72	37	72	0.1689	0.05812	270	2.91	0.0040	Tukey	0.0920
Temp*Hora	37	24	37	48	0.01462	0.05812	270	0.25	0.8016	Tukey	1.0000
Temp*Hora	37	24	37	72	0.01772	0.05812	270	0.30	0.7607	Tukey	1.0000
Temp*Hora	37	48	37	72	0.003098	0.05812	270	0.05	0.9575	Tukey	1.0000

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The FREQ Procedure

Frequency Expected Deviation Cell Chi-Square Percent Row Pct Col Pct	Table of Fimbria by Biofilme			
	Fimbria	Biofilme		Total
		NOP	YES	
	NOP	8	76	84
		4.0645	79.935	
		3.9355	-3.935	
		3.8105	0.1938	
		4.30	40.86	45.16
		9.52	90.48	
		88.89	42.94	
	YES	1	101	102
		4.9355	97.065	
		-3.935	3.9355	
		3.1381	0.1596	
		0.54	54.30	54.84
		0.98	99.02	
		11.11	57.06	
	Total	9	177	186
		4.84	95.16	100.00
Frequency Missing = 93				

Statistics for Table of Fimbria by Biofilme

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	7.3020	0.0069
Likelihood Ratio Chi-Square	1	7.9959	0.0047
Continuity Adj. Chi-Square	1	5.5644	0.0183
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	7.2627	0.0070
Phi Coefficient		0.1981	
Contingency Coefficient		0.1944	
Cramer's V		0.1981	
WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.			

Fisher's Exact Test	
Cell (1,1) Frequency (F)	8
Left-sided Pr <= F	0.9994
Right-sided Pr >= F	0.0080
Table Probability (P)	0.0074
Two-sided Pr <= P	0.0118

Effective Sample Size = 186
Frequency Missing = 93

WARNING: 33% of the data are missing.

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The FREQ Procedure

Table of Fimbria by Biofilme									
Fimbria	Biofilme	Frequency	Expected	Deviation	Std Residual	Cell Chi-Square	Percent	Row Percent	Column Percent
NOP	NOP	8	4.0645	3.9355	2.7022	3.8105	4.30	9.52	88.89
	YES	76	79.9355	-3.9355	-2.7022	0.1938	40.86	90.48	42.94
	Total	84					45.16	100.00	
YES	NOP	1	4.9355	-3.9355	-2.7022	3.1381	0.54	0.98	11.11
	YES	101	97.0645	3.9355	2.7022	0.1596	54.30	99.02	57.06
	Total	102					54.84	100.00	
Total	NOP	9					4.84		100.00
	YES	177					95.16		100.00
	Total	186					100.00		

Frequency Missing = 93

Statistics for Table of Fimbria by Biofilme

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	7.3020	0.0069
Likelihood Ratio Chi-Square	1	7.9959	0.0047
Continuity Adj. Chi-Square	1	5.5644	0.0183
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	7.2627	0.0070
Phi Coefficient		0.1981	
Contingency Coefficient		0.1944	
Cramer's V		0.1981	
WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.			

Fisher's Exact Test	
Cell (1,1) Frequency (F)	8
Left-sided Pr <= F	0.9994
Right-sided Pr >= F	0.0080
Table Probability (P)	0.0074
Two-sided Pr <= P	0.0118

Effective Sample Size = 186
Frequency Missing = 93

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The FREQ Procedure

Frequency Expected Deviation Cell Chi-Square Percent Row Pct Col Pct	Table of Celulose by Biofilme			
	Celulose	Biofilme		
		NOP	YES	Total
	NOP	6	102	108
		5.2258	102.77	
		0.7742	-0.774	
		0.1147	0.0058	
		3.23	54.84	58.06
		5.56	94.44	
		66.67	57.63	
	YES	3	75	78
		3.7742	74.226	
		-0.774	0.7742	
		0.1588	0.0081	
		1.61	40.32	41.94
		3.85	96.15	
		33.33	42.37	
	Total	9	177	186
		4.84	95.16	100.00
Frequency Missing = 93				

Statistics for Table of Celulose by Biofilme

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.2874	0.5919
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.2943	0.5875
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0361	0.8494
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.2859	0.5929
Phi Coefficient		0.0393	
Contingency Coefficient		0.0393	
Cramer's V		0.0393	
WARNING: 25% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.			

Fisher's Exact Test	
Cell (1,1) Frequency (F)	6
Left-sided Pr <= F	0.8092
Right-sided Pr >= F	0.4321
Table Probability (P)	0.2413
Two-sided Pr <= P	0.7364

Effective Sample Size = 186
Frequency Missing = 93

WARNING: 33% of the data are missing.

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The FREQ Procedure

Table of Celulose by Biofilme									
Celulose	Biofilme	Frequency	Expected	Deviation	Std Residual	Cell Chi-Square	Percent	Row Percent	Column Percent
NOP	NOP	6	5.2258	0.7742	0.5361	0.1147	3.23	5.56	66.67
	YES	102	102.8	-0.7742	-0.5361	0.00583	54.84	94.44	57.63
	Total	108					58.06	100.00	
YES	NOP	3	3.7742	-0.7742	-0.5361	0.1588	1.61	3.85	33.33
	YES	75	74.2258	0.7742	0.5361	0.00808	40.32	96.15	42.37
	Total	78					41.94	100.00	
Total	NOP	9					4.84		100.00
	YES	177					95.16		100.00
	Total	186					100.00		

Frequency Missing = 93

Statistics for Table of Celulose by Biofilme

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.2874	0.5919
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.2943	0.5875
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0361	0.8494
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.2859	0.5929
Phi Coefficient		0.0393	
Contingency Coefficient		0.0393	
Cramer's V		0.0393	

WARNING: 25% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test	
Cell (1,1) Frequency (F)	6
Left-sided Pr <= F	0.8092
Right-sided Pr >= F	0.4321
Table Probability (P)	0.2413
Two-sided Pr <= P	0.7364

Effective Sample Size = 186
Frequency Missing = 93

WARNING: 33% of the data are missing.

Distribuição de Densidade de C_Caco2 por Biofilme

The LOGISTIC Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.EMI1
Response Variable	Biofilme
Number of Response Levels	2
Model	binary logit
Optimization Technique	Fisher's scoring

Number of Observations Read	279
Number of Observations Used	279

Response Profile		
Ordered Value	Biofilme	Total Frequency
1	NOP	14
2	YES	265

Probability modeled is Biofilme='YES'.

Model Convergence Status	
Convergence criterion (GCONV=1E-8) satisfied.	

Model Fit Statistics		
Criterion	Intercept Only	Intercept and Covariates
AIC	113.066	89.076
SC	116.697	96.338
-2 Log L	111.066	85.076

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-Square	DF	Pr > ChiSq
Likelihood Ratio	25.9902	1	<.0001
Score	26.8311	1	<.0001
Wald	18.8695	1	<.0001

Analysis of Maximum Likelihood Estimates					
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-8.1617	2.3797	11.7629	0.0006
C_Caco2	1	0.1830	0.0421	18.8695	<.0001

Odds Ratio Estimates	

Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
C_Caco2	1.201	1.106	1.304

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses			
Percent Concordant	84.6	Somers' D	0.716
Percent Discordant	13.0	Gamma	0.734
Percent Tied	2.5	Tau-a	0.068
Pairs	3710	c	0.858

Anexo II – Alinhamento de aminoácidos derivados do alinhamento de nucleotídeos dos fragmentos do gene *inlA* do isolado de *Listeria monocytogenes*. O alinhamento foi realizado com o programa BioEdit®, destacando regiões conservadas e possíveis mutações associadas à virulência da bactéria. Pontos indicam homologia com a cepa de referência (*Listeria monocytogenes* EGD-e, número de acesso: CP023861, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP023861.1/>).

[illegible]

	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
Lm EGD-e												
	TAAACAAATATTAATTGGCTTTCAGCTGGGCATAACCAAATTAGCGATCTTACACCATTTGGCTAATTTAAACAAGAATCACCCAAC TAGGGTTGAAAAATTTTAAATGTTAAGTTTCATGTG											
1LM	C.....G.....T.....T.....A.....C.....											
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Lm EGD-e												
	GACGGCAAAGAAACAACCAAAGAAGTGGGAAGCTGGGAATTTATTGACTGAACCAGCTAAGCCCGTAAAAGAAGGTCACACATTTGTGGTTGGTTTGATGCCCAACAGGCGGAAC TAA											
1LM	T.....T.T.....G.....C.....											
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Lm EGD-e												
	TGGAAATTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATCAATTTATATGCACAAATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACCTTTGATAATGACGGTGTAAACAACATCTCAAAACAGTAGAT											
1LM	G.....G.....G.....											
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Lm EGD-e												
	TATCAAGGCTTGTTACAAGAACCTACGGCACCAACAAAAGAAGGTTATACTTTTAAAGGCTGGTATGACGCAAAAAC TGGTGGTGACAAGTGGGATTTTCGCAACTAGCAAAATGCCTGCT											
1LM	C.....C.....T.....T..G.....											
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Lm EGD-e												
	AAAAACATCACCTTATATGCCCAATATAGCGCCAATAGCTATACAGCAACGTTTGATGTGATGGAAAATCAACGACTCAAGCAGTAGACTATCAAGGACTTCTAAAAGAACC AAAGGCA											
1LM	T.....C.....A.....AA.G											
	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Lm EGD-e												
	CCAACGAAAGCCGGATATAC TTTCAAAGGCTGGTATGACGAAAAAACAGATGGGAAAAAATGGGATTTTGCGACGGATAAAATGCCAGCAAATGACATTACGCTGTACGCTCAATTTACG											
1LM	A.....T.....T.....A.....T.....C.....											
	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	
Lm EGD-e												
	AAAAATCCTGTGGCACCAACCAACACTGGAGGGAACACCCGCCCTACAACAAATAACGGCGGGAATACTACACCACCTTCCGCAAATATACCTGGAAGCGACACATC											
1LM	T.....G..T.....A.....C.....A.....											

Anexo III – Alinhamento de aminoácidos derivados do alinhamento de nucleotídeos do gene *inlA* do isolado de *Listeria monocytogenes*. O alinhamento foi realizado com o programa BioEdit®, destacando regiões conservadas e possíveis mutações associadas à virulência da bactéria. Pontos indicam homologia com a cepa de referência (*Listeria monocytogenes* EGD-e, número de acesso: CP023861, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP023861.1/>)

[illegible]