



QUALIS
A2



**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA
COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM
MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ**

**STANDARDIZATION AND APPLICATION OF MULTIPLEX PCR FOR
THE DETECTION OF VIRULENCE GENES (ISS AND TSH) OF
ESCHERICHIA COLI IN CHICKEN SAMPLES MARKETING IN
MUNICIPAL MARKETS OF THE BRAGANTINA MICROREGION, PARÁ**

Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ

Universidade Federal do Pará (UFPA)

E-mail: mylladufosse@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7632-7734>

Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

E-mail: romulombio@outlook.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1947-4575>

Joelson Sousa LIMA

Universidade Federal do Pará (UFPA)

E-mail: joelsonbio@live.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0550-4318>

Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO

Universidade Federal do Pará (UFPA)

E-mail: anapaulasampaiio@hotmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7663-0848>

Adrianne Maria Brito Pinheiro da ROSA

Universidade Federal do Pará (UFPA)

E-mail: adriannemariabrito@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0392-077X>

José Roberto da Silva FILHO

Universidade da Amazônia (UNAMA)

E-mail: robertofilho12@hotmail.com.br

ORCID: <http://orcid.org/0009-0001-3758-9117>

Carina Martins de MORAES

Universidade Federal do Pará (UFPA)

E-mail: carinamoraes@ufpa.br

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7111-8159>

Talita Bandeira ROOS
Universidade Federal do Pará (UFPA)
E-mail: talitaroos@ufpa.br

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4630-1194>

RESUMO

Este estudo teve como objetivo padronizar e aplicar uma multiplex Reação em Cadeia da polimerase (mPCR) para a identificação dos genes de virulência resistência sérica (iss) e hemaglutinina (tsh) de *Escherichia coli* em amostras de frango oriundas de mercados municipais. Realizou-se a padronização da técnica de multiplex PCR utilizando os dois fatores de virulência, tendo como controles positivas de cepas de *E. coli* patogênicas, posteriormente, foram coletadas, de forma aleatória por conveniência, amostras de frangos em 16 municípios na microrregião Bragantina-PA, em seguida encaminhadas ao laboratório para o diagnóstico dos fatores de virulência pela mPCR. A técnica aplicada foi eficiente para caracterizar genotipicamente os isolados de *E. coli*, onde constatou-se que 87,5% das amostras apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados. Em 6,25% das amostras houve a amplificação do gene iss e em 87,5% para o gene tsh, sendo que apenas uma amostra dentre as aves analisadas apresentou ambos os fatores. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que a PCR Multiplex para os genes de virulência tsh e iss apresenta um grande potencial na caracterização de isolados de *E. coli*, podendo ser utilizada como alternativa para prevenção e fiscalização desse agente nos frangos comercializados.

Palavras-chave: Frango. Inspeção. DNA. APEC. Fatores de virulência.

ABSTRACT

This study aimed to standardize and apply a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay for the detection of the virulence genes serum resistance (iss) and hemagglutinin (tsh) of *Escherichia coli* in chicken samples obtained from municipal markets. The mPCR protocol was standardized using both virulence factors, employing pathogenic *E. coli* strains as positive controls. Subsequently, chicken

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ. Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ; Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES; Joelson Sousa LIMA; Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO; Adrienne Maria Brito Pinheiro da ROSA; José Roberto da Silva FILHO; Carina Martins de MORAES; Talita Bandeira ROOS. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS A2. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2026 – MÊS DE JANEIRO - Ed. 70. VOL. 01. Págs. 542-556. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

samples were collected by convenience sampling in 16 municipalities within the Bragantina microregion of Pará and submitted to the laboratory for molecular diagnosis of virulence factors using mPCR. The technique proved effective for the genotypic characterization of *E. coli* isolates, with 87.5% of samples showing at least one of the investigated genes. The *iss* gene was detected in 6.25% of samples, while *tsh* was detected in 87.5%; only one sample presented both genes simultaneously. Based on these findings, multiplex PCR targeting the *tsh* and *iss* virulence genes demonstrates strong potential for the genotypic characterization of *E. coli* isolates and may serve as a complementary tool for monitoring and controlling this agent in commercially sold chickens.

Keywords: Chicken. Inspection. DNA. APEC. Virulence factors.

INTRODUÇÃO

A carne de frango representa uma parte substancial da dieta humana (Font-I-Furnols et al, 2023). Diante da importância desse alimento, práticas modernas de produção de aves têm sido intensificadas, a fim de otimizar e aumentar a produção avícola. No entanto, essa intensificação na produção tem favorecido o surgimento e disseminação de doenças infecciosas (Zhu et al, 2023), o que pode ser principalmente observado em estabelecimentos informais, gerando riscos sanitários e à saúde de comerciantes, manipuladores e consumidores.

Nas regiões norte e nordeste do Brasil se encontra o maior número de abatedouros clandestinos de frango de corte, e na sua maioria, não tem nenhum tipo de inspeção sanitária, controle de higiene nem registros oficiais, recebendo eventualmente algum tipo de intervenção por parte dos órgãos fiscalizadores, atuando livremente nesta atividade de forma inadequada e precária (Benevides, 2015). Ressaltando que o abate e a comercialização em feiras livres de carcaça de frango sem inspeção sanitária ou sem o mínimo de controle higiênico sanitário e em total desacordo com a legislação vigente, configurando uma prática ilegal. Nesse sentido, Westpfal, Salomão e Almeida (2024) ressaltam que um dos principais desafios da avicultura no país é a garantia da biossegurança.

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ. Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ; Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES; Joelson Sousa LIMA; Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO; Adrienne Maria Brito Pinheiro da ROSA; José Roberto da Silva FILHO; Carina Martins de MORAES; Talita Bandeira ROOS. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS A2. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2026 – MÊS DE JANEIRO - Ed. 70. VOL. 01. Págs. 542-556. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

Estudos mostraram que algumas cepas de APEC são muito semelhantes aos patótipos extra intestinais que afetam os seres humanos e alguns autores apontam a avicultura como um reservatório para a EPEC humana, sugerindo assim um risco para a saúde pública (Saidenberg et al, 2022). Além disso, a presença de genes de resistência a múltiplas drogas e resistência entre os isolados de APEC é de alta significância (Ajibola et al, 2025; Liao et al, 2024; Racewicz et al, 2022), bem como genes de virulência, que estão relacionados à patogenicidade bacteriana, garantindo a multiplicação e persistência dos micro-organismos no hospedeiro.

Entre os genes responsáveis pelos fatores de virulência de *E. coli* (APEC), destacam-se, principalmente o tsh (hemaglutinina sensível à temperatura) e o iss (aumento da sobrevivência do soro), que estão relacionados, respectivamente, ao transporte de ferro, incluindo sideróforos, a fim de mediar a absorção de ferro do hospedeiro e a resistência sérica que promovem proteção bacteriana principalmente em relação à ação do sistema complemento (Awawdeh et al, 2024; Kim et al, 2020). Esses genes também podem estar envolvidos com a capacidade bacteriana de provocar a infecção sistêmica, posto que já foram detectados em APEC causadoras de surtos de septicemia (Maciel et al, 2017).

Tendo em vista que a APEC é um grupo heterogêneo de patógenos com uma ampla gama de características de virulência, na literatura inúmeros trabalhos procuram caracterizá-la e desenvolver metodologias para o seu diagnóstico. Assim, métodos para detecção rápida desses patógenos e ensaios de amplificação de DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido cada vez mais desenvolvidos e utilizados para obtenção de diagnósticos na indústria alimentícia, visando uma maior qualidade de seus produtos e segurança dos consumidores, além de contribuírem para evitar que surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorram. A PCR multiplex permite a detecção simultânea de várias sequências genômicas alvo, desde que estas apresentem perfis térmicos iguais.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi padronizar e aplicar uma Reação em Cadeia da polimerase multiplex para a identificação dos genes dos fatores de virulência de resistência sérica (iss) e hemaglutinina (tsh) de *E. coli* e verificar se

estão presentes em amostras de frango oriundas de mercados municipais, localizados em cidades pertencentes a Microrregião Bragantina, no estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi realizada a extração do DNA bacteriano de cepa de *E. coli* patogênica, oriunda da coleção de cepas do Laboratório de Microbiologia – Instituto de Medicina Veterinária (IMV)-UFPA/Castanhal, a técnica aplicada para extração se deu por meio de lise térmica seguindo o protocolo de Rocha, et al. (2008), para tal, as amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24h a 37 °C, 1mL da suspensão deste cultivo foi coletado e centrifugado por 5min a 13.200rpm. O sobrenadante foi descartado e 800µL de água Milli-Q foram adicionados. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado, e 80µL de água Milli-Q foi adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à temperatura de 96°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e mantido congelado em tubos de polipropileno a -20°C até o momento da análise molecular. O DNA extraído, foi quantificado por espectrofotometria em filtro de 260nm e a pureza avaliada a partir da razão das leituras em 260nm/280nm. Os DNAs obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) a 0,5%, sendo em seguida imerso em corante não mutagênico (Gelred) e visualizados com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao Software Total Lab. TL 100v. 2006. Para a realização das reações da mPCR foram utilizados iniciadores (primers), previamente descritos por Rocha et al. (2008), para amplificação dos fragmentos de genes dos fatores de virulência de resistência sérica (iss) e hemaglutinina (tsh) de *E. coli*, sendo, tsh Rev: 5'GGT GGT GCA CTG GAG TGG3' e tsh For: 3'AGT CCA GCG TGA TAG TGG5'; iss Rev: 5'GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC3'; iss For: 3'CGC CTC GGG GTG GAT AA5'.

Para a padronização da mPCR foi adotada uma mistura de reagentes calculado para um volume final de 25 µL para cada reação. Para tal, foram utilizados 50 mM de

MgCl e 10 mM Tris-HCl (tampão 10X), 10 mM DNTP mix, aproximadamente 60 ng de DNA molde, 1 U Taq DNA Polimerase e 20 pmol de cada primer, sendo o volume completado com água ultrapura esterilizada. O termociclador (Applied Biosystems VERITI® 96) foi programado para 30 ciclos, na qual as temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente: 94°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, e 58°C por 1 minuto, acrescidos de desnaturação inicial a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos, e o produto amplificado foi submetido em gel agarose a 1,5% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5% e corado com Gelred (corante não mutagênico). A análise dos resultados foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao Software Total Lab. TL Lab 5.2. Para especificidade do ensaio de PCR foram utilizadas cepas de *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, submetidos às mesmas condições de extração de DNA, concentração de DNA e aplicado ao protocolo.

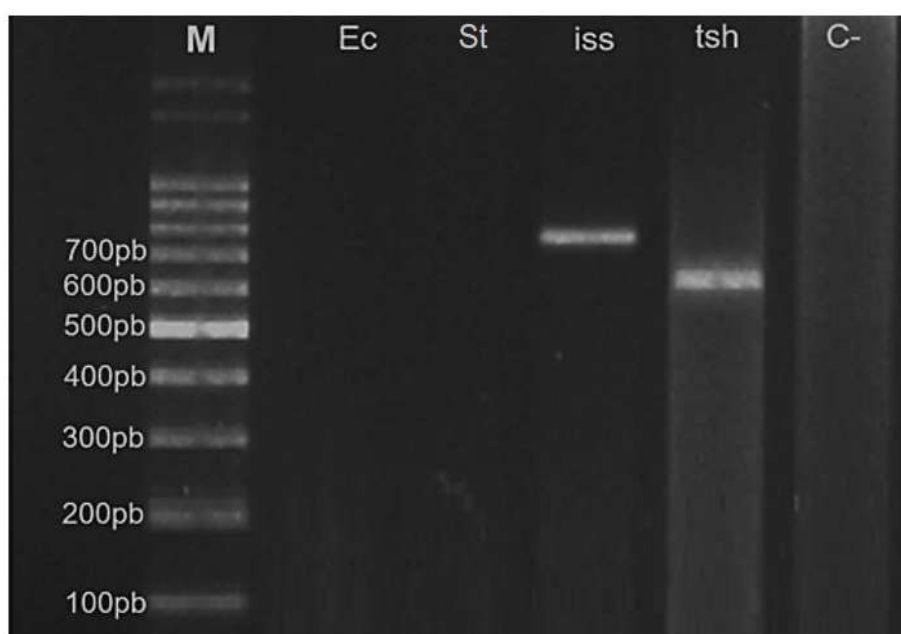
Em seguida, foram coletadas 16 amostras de frango disponíveis no comércio, a coleta foi aleatória por conveniência em mercados municipais, localizados em cidades pertencentes à Microrregião Bragantina, no estado do Pará (IBGE, 2019). A Microrregião é composta por 13 municípios: Augusto Corrêa, Bonito, Bragança, Capanema, Igarapé-Açu, Nova Timboteua, Peixe-Boi, Primavera, Quatipuru, Santarém Novo, São Francisco do Pará, Santa Maria do Pará e Tracuateua. Após as coletas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas e encaminhadas ao Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos, IMV, UFPA, para aplicação da mPCR.

Para a mPCR foram utilizados a traqueia das aves coletadas, fragmento do órgão estudado foram adicionadas ao meio de cultura em caldo de infusão de cérebro coração (Brain Heart Infusion -BHI) (1:10), previamente incubadas por 24h, a 37 °C, sucessivamente realizar a etapa de extração de DNA seguindo o protocolo descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR multiplex proposta neste estudo apresentou boa precisão para identificar os genes *iss* e *tsh*, responsáveis por fatores de virulência de *Escherichia coli*. Os iniciadores utilizados amplificaram especificamente os controles positivos para cada gene e não houve reação cruzada com as outras cepas bacterianas testadas, conforme pode ser observado na figura 1.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose à 1,5% demonstrando a presença de fragmentos de DNA de fatores de virulência de *E. coli*, onde: M - marcador molecular 100kb; St: *Salmonella* sp.; Lm: *Listeria monocytogenes*; *iss* (760pb): fator de virulência resistência sérica; *tsh* (620pb): fator de virulência hemaglutinina; C-: controle negativo.



Fonte: Autores.

A PCR multiplex, quando bem padronizada, apresenta muitas vantagens como praticidade, economia de reagentes e diminuição do tempo das análises, no mais, permitem a implementação de tal metodologia na rotina de diagnóstico em diferentes laboratórios (Zhao et al, 2026). Todavia, comparado ao presente estudo apresentamos a vantagem de se identificar *E. coli* patogênica por meio de seus fatores de virulência de modo simultâneo. Ressaltando que a técnica utilizada torna possível a detecção de agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento, como a

detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos (Garrido et al, 2023; Ledger et al, 2026). Esse método se mostrou confiável e rápido esquema de diagnóstico em estudos realizados por Azam et al, (2019) onde, realizaram a caracterização molecular de isolados de APEC recuperados de frangos de corte doentes.

A mPCR proposta foi eficiente também na detecção dos genes de virulência de *E. coli* em amostras de campo, isto é, em frangos naturalmente infectados pela bactéria. Os resultados dessas análises estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Detecção dos genes de virulência *tsh* (hemaglutinina sensível à temperatura) e *iss* (aumento da resistência sérica) em amostras de frango coletadas em mercados públicos de diferentes municípios do estado do Pará, por meio de PCR multiplex. (+): gene detectado; (-): gene não detectado.

Amostra	Município	<i>tsh</i>	<i>iss</i>
1	Augusto Corrêa	+	-
2	Bonito	+	-
3	Bragança	+	-
4	Capanema	+	-
5	Capanema	+	-
6	Igarapé-Açu	-	-
7	Nova Timboteua	+	-
8	Peixe-Boi	+	+
9	Primavera	+	-
10	Quatipuru	+	-
11	Santarém Novo	+	-
12	São Francisco do Pará	+	-
13	Santa Maria do Pará	+	-
14	Santa Maria do Pará	+	-
15	Tracuateua	+	-
16	Tracuateua	-	-

Fonte: Autores.

Dessa forma, a frequência de fatores de virulência nas amostras de frango analisadas foi de 87,5%. Com base nos resultados do presente estudo é possível

inferir que a porta de entrada mais frequente da bactéria é o trato respiratório superior, ocorrendo a multiplicação do agente na traqueia com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes, conforme também já observado na literatura (Kromann et al, 2021).

Além disso, dados da literatura demonstram que existe uma alta incidência de *E. coli* patogênica (APEC) em frangos de corte em pesquisas realizadas nos Estados Unidos da América (Runcharoon; Favro; Logue, 2025), Espanha (Monroy; Catalá-Gregori; Sevilla-Navarro, 2025), Brasil (Pilati et al, 2024), Alemanha (Müller et al, 2024), Jordânia (Ibrahim et al, 2019), República Tcheca (Papouskova et al, 2020) e Índia (Jandhai et al, 2025), que confirmaram a presença de genes de virulência pertencentes ao grupo APEC, em frangos de corte.

Das amostras positivas, todas as amostras amplificaram o gene da hemaglutinina sensível à temperatura (tsh), responsável pela síntese de proteínas termo-sensíveis, que possuem capacidade hemaglutinante e auxiliam nos estágios iniciais de infecções em aves (auto). Já em uma amostra (6,25%), coletada no município de Peixe-Boi, foi possível observar a amplificação do fator de virulência relacionado ao aumento da resistência aos efeitos prejudiciais do soro, gerando maior taxa de sobrevivência do agente no hospedeiro (iss).

No trabalho de Maluta et al. (2014) o gene iss foi detectado numa frequência de 51,3%. Por seu turno, Cunha et al. (2014) identificaram esse mesmo gene em 93% dos isolados de *E. coli* associados a aerossaculite em perus. Dados que corroboram com os nossos resultados. Rocha et al. (2008) evidenciaram, nas amostras de frango de corte com problemas respiratório, a presença de sete fatores de virulência, sendo o gene iss detectado em 73,8% e o tsh em 55,7% das amostras. No entanto, não se pode excluir a probabilidade de animais assintomáticos apresentarem o micro-organismo em questão e estarem sendo comercializados sem nenhuma fiscalização rigorosa.

Todavia, apenas uma amostra (6,25%) apresentou os dois genes amplificados simultaneamente, resultados semelhantes já foram reportados por Bonnet et al, (2009), os quais identificaram a presença de ambos os fatores de virulência em

frangos de cortes na maioria dos isolados de APEC, afirmando que essa combinação serve como bons marcadores para os casos de APEC. Com respeito aos dados do presente estudo, embora as aves apresentarem-se aparentemente saudáveis no momento das coletas, a identificação de *E. coli* patogênica representa uma alerta para a qualidade desse alimento que incide na saúde do consumidor.

Devido as aves já terem sido encontradas abatidas, apenas aspectos macroscópicos podem ser levados em consideração, o que não exclui o potencial risco de invasão e disseminação pela bactéria, visto que genes que favorecem a sobrevivência e escape do sistema imune foram identificados, bem como a hipótese de naquele momento não ser notado a presença de lesões, por conta ao curso clínico da patologia se encontrar nos estágios iniciais.

Vale ressaltar que apenas duas amostras (12,5%) não apresentaram nenhum dos genes amplificados, entretanto, mesmo que os isolados não apresentem os genes necessários para causar infecções em outros animais, eles possuem potencial para adquirir fatores de virulência de outras cepas de *E. coli* presentes no meio ambiente ou por estarem em contato com outras aves infectadas (Mageiros et al, 2021).

Maluta et al. (2014) identificaram a presença dos genes *iss* e *tsh* também em *E. coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) em humanos, onde compararam cepas de APEC com cepas patogênicas extraintestinais de *E. coli* (ExPEC) isoladas de casos clínicos de humanos com doenças extraintestinais, como infecções do trato urinário (ITU) e bacteremia. Por esse motivo, APEC incidem em dois tipos de problema: o potencial zoonótico dessas cepas, já que muitos isolados APEC são estreitamente relacionadas com ExPEC humanas (NMEC e UPEC), e a multirresistência desses micro-organismos aos antimicrobianos.

A importância da detecção desse material genético, além de evidenciar a eficiência da técnica de mPCR para a identificação de *E. coli* patogênica, permite sugerir que a presença de genes de virulência no DNA de bactérias como *E. coli* nas amostras coletadas, podem estar associados a precariedade higiênica e sanitária durante a cadeia produtiva desses frangos, bem como durante a manipulação e armazenamento nos estabelecimentos em que são vendidos.

Outro fator preocupante é a comercialização do frango sem nenhum tipo de fiscalização ou controle por órgãos competentes. As amostras desse estudo foram adquiridas em mercados municipais, onde se pôde notar condições sanitárias incipientes e a ausência de boas práticas, o que se torna de extrema preocupação, uma vez que em municípios do interior há um grande consumo de alimentos em feiras livres e mercados municipais, uma característica cultural dessas comunidades.

Para Benevides (2015), o maior número de abatedouros clandestinos de frango de corte está localizado nas regiões norte e nordeste do Brasil e a maior parte deles não possui nenhum tipo de inspeção sanitária, controle de higiene ou registros oficiais, recebendo eventualmente algum tipo de intervenção por parte dos órgãos fiscalizadores.

O mesmo autor citado anteriormente, afirma que esses abatedouros atuam livremente nesta atividade, de forma inadequada e precária. Sabe-se, ainda, que a maioria desses estabelecimentos não possui plataforma de recepção das aves e nem divisão de áreas entre os procedimentos de abate, todas as etapas de abate ocorrem em um único local ou até mesmo ao ar livre, fatores estes considerados como pontos críticos para a contaminação das carcaças de frango, principalmente por bactérias patogênicas como as APECs.

Assim, ratifica-se a necessidade de novas tecnologias para detecção da patogenicidade dos isolados de *E. coli* de maneira objetiva, rápida e eficiente, principalmente, em aves ou carcaças de aves que serão comercializadas, além de contribuir com órgãos vigentes para fiscalização de forma mais rigorosa no diagnóstico e manuseio adequado dos animais abatidos em feiras municipais.

CONCLUSÃO

A PCR utilizada no presente estudo foi eficaz para a identificação dos fatores de virulência de *E. Coli* testados, assim representando uma importante ferramenta para o diagnóstico de APECs. A presença de genes de virulência em amostras de frango comercializadas são uma alerta para os órgãos de fiscalização, relacionados a inspeção de produtos de origem animal e a saúde pública. Nossos resultados apontam

para a necessidade de medidas de prevenção da contaminação por micro-organismos patogênicos e da adoção de melhorias higiênico-sanitárias nos estabelecimentos de abate e comercialização de carne de frango.

REFERÊNCIAS

AJIBOLA, A. T. et al. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles of *Escherichia coli* isolated from poultry farms using One Health perspective in Abeokuta, Nigeria. **BMC Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 440. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04135-9>. Acesso em: 21 dez. 2025.

AWAWDEH, L. et al. Virulence-associated genes in faecal and clinical *Escherichia coli* isolates cultured from broiler chickens in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 102, n. 8, p. 398-406. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/avj.13339>. Acesso em: 21 dez. 2025.

AZAM, M. et al. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli* from colibacillosis affected broilers in Pakistan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1259-1265. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01823-3>. Acesso em: 24 dez. 2025.

BENEVIDES, W. S. **Processos de abate de aves: industrial e a outra realidade**. Ciência Animal, v. 25, n. 1, p. 155-166. 2015. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/14275/12128>. Acesso em: 18 out. 2023.

BONNET, C. et al. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 6955-6962. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00375-09>. Acesso em: 19 dez. 2025.

CUNHA, M. P. V. et al. Virulence profiles, phylogenetic background, and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from turkeys with airsacculitis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-9. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/289024>. Acesso em: 30 nov. 2025.

FONT-I-FURNOLS, M. Meat consumption, sustainability and alternatives: an overview of motives and barriers. **Foods**, v. 12, n. 11, p. 2144. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12112144>. Acesso em: 29 dez. 2025.

GARRIDO, P. et al. Assessing the utility of multiplexed polymerase chain reaction in detecting microorganisms causing infections in critically ill patients. **Current Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 348. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03461-3>. Acesso em: 12 nov. 2025.

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ. Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ; Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES; Joelson Sousa LIMA; Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO; Adrienne Maria Brito Pinheiro da ROSA; José Roberto da Silva FILHO; Carina Martins de MORAES; Talita Bandeira ROOS. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS A2. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2026 – MÊS DE JANEIRO - Ed. 70. VOL. 01. Págs. 542-556. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Cidades**. 2019. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em: 24 jun. 2023.

IBRAHIM, R. A. et al. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 159. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1901-1>. Acesso em: 15 nov. 2025.

JANDHAI, P. et al. An insight into newly emerging avian pathogenic *E. coli* serogroups, biofilm formation, ESBLs and integron detection and in vivo pathogenicity in chicken. **Microbial Pathogenesis**, v. 200, p. 107309. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107309>. Acesso em: 30 dez. 2025.

KIM, Y. B. et al. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 1088-1095. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.047>. Acesso em: 28 dez. 2025.

KROMANN, S. et al. Development of an aerogenous *Escherichia coli* infection model in adult broiler breeders. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19556. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98270-8>. Acesso em: 26 nov. 2025.

LEDGER, L. et al. Insights from 17 years of culture and PCR detection of animal mollicutes in a Canadian provincial laboratory. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 38, n. 1, p. 140-147. 2026. DOI: <https://doi.org/10.1177/10406387251377526>. 28 dez. 2025.

LIAO, C. et al. Antimicrobial multidrug resistance of *Escherichia coli* from broiler farms in Zhanjiang, China. **PLoS One**, v. 20, n. 11, e0335518. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0335518>. Acesso em: 22 dez. 2025.

MACIEL, J. F. et al. Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 119-122. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.020>. Acesso em: 16 dez. 2025.

MAGEIROS, L. et al. Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. **Nature communications**, v. 12, n. 1: 765. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>. Acesso em: 20 dez. 2025.

MALUTA, R. P. et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 8. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105016>. Acesso em: 1 jan. 2026.

MONROY, I.; CATALÁ-GREGORI, P.; SEVILLA-NAVARRO, S. Assessment of antibiotic

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ. Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ; Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES; Joelson Sousa LIMA; Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO; Adrienne Maria Brito Pinheiro da ROSA; José Roberto da Silva FILHO; Carina Martins de MORAES; Talita Bandeira ROOS. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS A2. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2026 – MÊS DE JANEIRO - Ed. 70. VOL. 01. Págs. 542-556. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

resistance and virulence in *Escherichia coli* strains isolated from poultry in Spain. **Poultry Science**, v. 104, n. 2, p. 104838. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.104838>. Acesso em: 1 jan. 2026.

MÜLLER, A. et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from broilers with cellulitis. **Poultry Science**, v. 103, n. 6, p. 103704. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103704>. Acesso em: 23 dez. 2025.

PAPOUSKOVA, A. et al. Genomic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from diseased chicken in the Czech Republic. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 189. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02407-2>. Acesso em: 1 jan. 2026.

PILATI, G. V. T. et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* from Brazilian broilers. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1463. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071463>. Acesso em: 1 jan. 2026.

RACEWICZ, P. et al. Prevalence and characterisation of antimicrobial resistance genes and class 1 and 2 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolated from poultry production. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6062. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09996-y>. Acesso em: 27 dez. 2025.

ROCHA, A. C. G. P. et al. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 183-186. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000300009>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RUNCHAROON, K.; FAVRO, M. E.; LOGUE, C. M. Longitudinal analysis of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) serogroups and pathotypes from avian colibacillosis in Georgia: a continued investigation — year 2 analysis. **Poultry Science**, v. 104, n. 2, p. 104722. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2024.2403414>. Acesso em: 1 jan. 2026.

SAIDENBERG, A. B. S. et al. Genomic analysis of the zoonotic ST73 lineage containing avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). **Veterinary Microbiology**, v. 267: 109372. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109372>. Acesso em: 28 dez. 2025.

WESTPFAL, J.; SALOMÃO, L. K.; CAMPOS ALMEIDA, L. Acompanhamento e avaliação dos desafios da produção de aves de postura em sistema caipira nas fases de cria e recria – relato de caso. **Natureza Online**, v. 22, n. 1, 2024. Disponível em: <https://www.naturezaonline.com.br/revista/article/view/565>. Acesso em: 25 dez. 2025.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 215-

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (ISS E TSH) DE ESCHERICHIA COLI EM AMOSTRAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS EM MERCADOS MUNICIPAIS DA MICRORREGIÃO BRAGANTINA, PARÁ. Mylla Christy da Silva DUFOSSÉ; Francisco Rômulo Oliveira MAGALHÃES; Joelson Sousa LIMA; Ana Paula Presley Oliveira SAMPAIO; Adrienne Maria Brito Pinheiro da ROSA; José Roberto da Silva FILHO; Carina Martins de MORAES; Talita Bandeira ROOS. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS A2. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2026 – MÊS DE JANEIRO - Ed. 70. VOL. 01. Págs. 542-556. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

224. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.021>. Acesso em: 28 nov. 2025.

ZHAO, J. et al. Breaking through PCR multiplexing barriers: a shared-label-tagged primer design enables high-efficiency single-reaction booster PCR (SLP-bPCR). **Analytica Chimica Acta**, v. 1383, p. 344869. 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344869>. Acesso em: 15 jan 2026.

ZHU, Y. et al. Deciphering risks of resistomes and pathogens in intensive laying hen production chain. **Science of the Total Environment**, v. 869, p. 161790. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161790>. Acesso em: 17 nov. 2025.