

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LORENA NATALINO HABER GARCIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
DE ABATEDOURO MISTO DE BOVINOS E SUÍNOS**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2021

LORENA NATALINO HABER GARCIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
DE ABATEDOURO MISTO DE BOVINOS E SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2021

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G216e
2021

Garcia, Lorena Natalino Haber, 1990-
Identificação e caracterização de *Escherichia coli*
diarreiogênica de abatedouro misto de bovinos e suínos / Lorena
Natalino Haber Garcia. – Viçosa, MG, 2021.
69 f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Diarreia. 3. Epidemiologia
Molecular. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 579.342

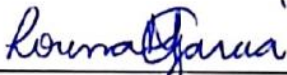
LORENA NATALINO HABER GARCIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA DE ABATEDOURO MISTO DE BOVINOS E SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Lorena Natalino Haber Garcia
Autora



Ricardo Seiti Yamatogi
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que iluminou meu caminho durante essa jornada.

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim e em meu potencial. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram a esperança para seguir. Pai, sua determinação enfrentando com fé cada etapa deste ano me deu o incentivo a persistir e encarar cada etapa. E a minha irmã, pelos conselhos, companhia e amor incondicional.

Ao meu orientador Ricardo Seiti Yamatogi, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e apoio. Por acreditar em meu trabalho, me incentivar e me fazer crescer como pesquisadora.

Ao Luis Augusto Nero, meu coordenador, pela disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos de maneira ímpar.

Ao professor Marcus Vinicius Coutinho Cossi por abrir as portas de seu laboratório na UFU, me recebendo tão bem, não medindo esforços para que minha pesquisa acontecesse da melhor maneira possível.

A todos os demais professores que contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional nesta jornada, seja em aulas, palestras, cursos e orientações. Em especial Vanerli Beloti, minha “mãe-científica”, responsável por plantar a sementinha da Inspeção de Produtos de Origem Animal em meu coração, Eduardo Delbon Baldini e Fábio Sossai, pela jornada e conhecimentos compartilhados em tempos de UNESP, e ao professor José Paes de Almeida Nogueira Pinto meu orientador de residência. Todos vocês são meus espelhos na docência.

A equipe de trabalho da UFU, minha gratidão: Sthéfany, Leticia, Yago e Karem pela ajuda nos preparos de meios de cultura, coletas e análises das amostras, por tornarem esse período de aprendizado leve, divertido e muito enriquecedor, sem vocês nada disso seria possível.

Aos funcionários do frigorífico que possibilitaram a coleta das amostras para meu projeto, sempre muito atenciosos, solícitos e dispostos a colaborar.

Aos colegas de convivência diária do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Biologia Molecular.

Às minhas grandes amigas de laboratório, por compartilharem muito mais que a bancada de experimento e fazer com que meu período de Mestrado se tornasse tão especial: Rafaela, Milimani, Viviane, Bruna, Juliana, Carolina, Thaiza, Nathalia, Mirian e Laura.

Aos meus queridos amigos da vida, Pedro, Jéssica Prieto, Kellen, Juliana, Bárbara, Laís, Lucas e Jéssica Fernandes que mesmo longe se fazem presente no meu dia a dia.

A todos aqueles que contribuíram para que este projeto se tornasse possível, minha eterna gratidão.

Agradeço a agência financiadora CAPES pela concessão de recursos usados nesta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Pesquisar é acordar para o mundo.”

Marcelo Lamy

RESUMO

GARCIA, Lorena Natalino Haber, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Identificação e caracterização de *Escherichia coli* Diarreiogênica de abatedouro misto de bovinos e suínos.** Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Escherichia coli é um agente patogênico distribuído mundialmente e causador de uma série de infecções intestinais e extra intestinais. Devido as características de transmissão desse microrganismo, diversos surtos alimentares acontecem anualmente em todo mundo, principalmente pela relação com as cadeias produtivas animais. Deste modo, o objetivo deste estudo foi a avaliação de isolados de *Escherichia coli* patogênica obtidas em abatedouro misto (bovinos e suínos) afim de verificar possíveis rotas de contaminação cruzada entre diferentes espécies abatidas no mesmo local. Os isolados foram caracterizados quanto a sua virulência, patótipos, subtipos de Shiga-toxina, filogrupos, sorogrupos O157, O104 e *big six* e por fim foram determinadas associações entre os isolados com o reservatório animal, amostra e pontos de coleta. De 697 isolados confirmados como *E. coli*, 33 foram classificados como diarreiogênicos, sendo STEC/ EHEC (n= 21), aEPEC (n=10) and ETEC (n=2). Um total de 21 isolados produtores de Shiga-toxina foram analisados e classificados como: *stx1* (n= 9), *stx2* (n= 11) e para os genes *stx1* e *stx2* simultaneamente (n= 3). Em relação aos subtipos *stx1*, foram classificados como *stx1a* (n=7) e *stx1c* (n=1). Para os subtipos *stx2* foram agrupados em *stx2b* (n=3), *stx2c* (n=8), *stx2d* (n=8), *stx2f* (n=1) and *stx2g* (n=2). A análise dos filogrupos classificou os isolados pelos métodos de Clermont, mostrando que B1 foi o filogrupo mais predominante. Três isolados de EPEC foram identificados como pertencentes ao sorotipo O26. Por meio da técnica de PFGE estabeleceu-se uma correlação entre filogrupos e patótipos. Os resultados obtidos indicam que não houve contaminação cruzada entre diferentes espécies abatidas em um mesmo local.

Palavras-chave: *E. coli*. Diarreia. Epidemiologia molecular.

ABSTRACT

GARCIA, Lorena Natalino Haber, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. **Identification and characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from a mixed cattle and swine's slaughterhouse.** Advisor: Ricardo Seiti Yamatogi.

Escherichia coli is a pathogenic agent distributed worldwide and causes a series of intestinal and extra intestinal infections. Due to the transmission characteristics of this microorganism, several food outbreaks occur annually throughout the world, mainly due to the relationship with animal production chains. Thus, the aim of this study was evaluated pathogenic *E. coli* isolated from mixed slaughterhouse (bovine and swine) in order to verify possible cross-contamination routes between different species slaughtered in the same place. Besides to detect virulence factors, pathotypes, subtypes of Shiga-toxin, phylogroup, serogroup O157, O104 and "big six" serogroup of *Escherichia coli* strains and to determine the association of this isolates with the animal reservoir, sample, and collection points. From 697 isolates confirmed as *E. coli*, 33 were classified as diarrheagenic group, and from this total STEC/ EHEC (n= 21), aEPEC (n=10) and ETEC (n=2). A total of 21 isolates of Shiga-toxin producing were analyzed and classified as: *stx1* (n= 9), *stx2* (n= 11) and for the both genes *stx1* and *stx2* simultaneously (n= 3). Therefore, gene *stx2* was more prevalent than *stx1*, there was no statistical difference between the results (P value < 0.05). Regarding *stx1* subtyping, were classified as *stx1a* (n=7) and *stx1c* (n=1). For *stx2* subtypes was as follows: *stx2b* (n=3), *stx2c* (n=8), *stx2d* (n=8), *stx2f* (n=1) and *stx2g* (n=2). Phylotyping analysis according Clermont methodology demonstrated majority of isolates as group B1. Three EPEC isolates were identified as belonging to serotype O26. PFGE showed a correlation between phylogroups and pathotypes. The results obtained shows that there was no cross-contamination between different species slaughtered in the same place.

Keywords: *E. coli*. Diarrhea. Molecular epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1. Patótipos de <i>E. coli</i> diarreiogênicas e seus principais mecanismos de virulência conforme Kaper et al., 2014	21
Figura 2. Árvore filogenética de acordo com Clermont et al., 2000	28
Figura 3. Atual interpretação dos resultados de PCR para os grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> de acordo com Clermont et al., 2013	30

CAPÍTULO 2:

Figure 1. PFGE dendograms of 33 isolates from swine and cattle.....	56
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2:

Table 1. Swine, bovine and environment sample collected from different points from a mixed slaughterhouse 51

Table 2. Distribution of *stx* subtypes, virulence genes, pathotype, serogroup and phylogroup in 33 strains from swine and cattle.....55

APPENDIX:

Appendix A.....68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica	14
1. Evolução do mercado de carnes no Brasil	15
2. Relação entre contaminação e carne bovina e suína	16
3. Epidemiologia de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica (DEC) no Brasil	17
3.1. <i>E. coli</i> enterotoxigênica – ETEC.....	21
3.2. <i>E. coli</i> enteroinvasiva – EIEC	22
3.3. <i>E. coli</i> enteropatogênica – EPEC	22
3.4. <i>E. coli</i> difusamente aderente – DAEC	23
3.5. <i>E. coli</i> enteroagregativa – EAEC.....	24
3.6. <i>E. coli</i> produtora de Shiga-toxina/ Enterohemorrágica - STEC / EHEC.	25
4. Grupos filogenéticos - Classificação segundo Clermont.....	27
REFERÊNCIAS	30
OBJETIVOS	46
Objetivo Geral	46
Objetivo Específico.....	46
CAPÍTULO 2 – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: "Identification and characterization of Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> from a mixed cattle and swine's slaughterhouse.....	47
ABSTRACT	49
1. Introduction.....	50
2. Material and Methods	50
2.1. Sampling.....	50
2.2. <i>E. coli</i> detection and characterization	51

SUMARIO

2.3. Detection of <i>E. coli</i> pathotypes by multiplex PCR.....	52
2.4. Phylogroup determination – Clermont Classification	53
2.5. Identification of <i>hlyA</i> , <i>stx1/stx2</i> and characterization of Shiga Toxins subtyping	53
2.6. O157 and <i>big six</i> identification by molecular method.....	53
2.7. PFGE	54
2.8. Statistical analysis.....	54
3. Results.....	54
4. Discussion	56
5. Conclusion.....	59
6. Bioethics and Biosecurity Committee Approval.....	59
7. Acknowledgements	59
REFERENCES.....	60
APPENDIX.....	68

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país fortemente representado pelo agronegócio e a produção de carnes ocupa uma importante parcela neste setor (IBGE, 2017). No ano de 2019 o consumo nacional médio de carne bovina e suína foi de respectivamente 38,3 kg per capita e 15,3 kg per capita. Em relação aos índices de exportação o Brasil tem destaque no setor, ocupando o 1º lugar para carne de origem bovina e 4º lugar para carne de origem suína (ABIEC, 2020; ABPA, 2020).

Devido à alta representatividade no mercado, é necessária que a produção de carne siga padrões de qualidade e inocuidade em cada uma das etapas de produção, como a implementação de programas de controle visando reduzir a contaminação bem como o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (DOYLE e BUCHANAN, 2007). Estas medidas visam garantir não só a qualidade do produto, mas também a segurança do consumidor, uma vez que alimentos são frequentemente envolvidos em surtos alimentares (FAO, 2005).

Nas Américas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO) 77 milhões de pessoas adoecem e mais de 9.000 vão à óbito por doenças de origem alimentar. Deste total, 95% são vinculadas as doenças diarreicas (OPAS/OMS, 2019). Dados brasileiros vinculados ao Ministério da Saúde, relatam que entre os anos de 2009 e 2018 cerca de 85% dos surtos alimentares foram causados por bactérias, sendo *E. coli* o agente mais envolvido em casos reportados no ano de 2018, totalizando 27,5% de caso confirmados, 5,3% referentes a carne bovina e 2,0% referentes a carne suína (SVS/MS, 2019).

Escherichia coli é responsável por causar uma série de doenças e por isto, esta espécie bacteriana possui grupos como, por exemplo, *E. coli* diarreiogênicos (DEC) os quais podem ser divididos em seis grupos de acordo com seu mecanismo de virulência, conhecidos como patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) e *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC) (CROXEN et al., 2013).

Todos estes patótipos estão envolvidos em surtos alimentares, porém STEC são particularmente mais destacadas no âmbito da saúde pública como importante agente zoonótico devido ao fato de estarem naturalmente presentes no trato

gastrointestinal de animais de produção, podendo levar a infecção humana através do consumo de carnes (ELDER et al., 2000). Uma vez estabelecida a infecção, STEC pode provocar colite hemorrágica (CH), além de enfermidades extra intestinais, como a Síndrome Urêmica-Hemolítica (SHU), lesão renal e Púrpura Trombocitopênica (PTT) (TARR et al., 2005; CASTRO et al., 2017).

Embora já houvesse na década de 1970 associação entre doença humana e diarreia, a importância como patógeno humano ganhou notoriedade a partir do ano 1982, em um grande surto envolvendo o sorotipo O157:H7 com quadros de CH e SHU, o fato foi relacionado ao consumo de hambúrgueres mau cozidos (RANGEL et al., 2005). A partir de então outros casos foram sendo relacionados com este patógeno a partir da correlação entre epidemiologia da doença e os sinais clínicos apresentados.

Com o passar dos anos e avanços em relação a biologia molecular, foram evidenciados outros sorogrupos relevantes quanto às infecções do trato gastrointestinal em humanos, conhecidos como “big six”, composto pelos grupos O26, O103, O111, O45, O121 e O145 (JOHNSON et al., 2006; CAPRIOLI et al., 2005).

A determinação da presença de *Escherichia coli* diarreiogênicas é necessária para discriminar os principais pontos de controle na cadeia, aplicando medidas e que visam a inocuidade e a qualidade dos produtos de origem animal a serem ofertados aos consumidores. Portanto, é objetivo deste trabalho caracterizar o potencial das cadeias de abate e processamento em bovinos e suínos, em uma mesma linha de abate, como fonte de disseminação de *Escherichia coli* diarreiogênica entre animais, ambiente de produção, alimentos e humanos. Bem como a avaliação dos principais fatores de patogenicidade e perfil de virulência apresentado por estes isolados.

CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica

Lorena Natalino Haber Garcia

1. Evolução do mercado de carnes no Brasil

Com o passar dos anos, o agronegócio brasileiro foi se modernizando e se especializando até chegar nos dias atuais, em que a suinocultura e a bovinocultura contam com altos recursos de tecnologia em relação a manejo, produção e abate. A chegada dos primeiros bovinos no Brasil ocorreu junto com a fundação da Ilha de São Vicente em 1533. A ocupação do território por estes animais ocorreu inicialmente nas capitanias do litoral, e pouco a pouco foram adentrando às regiões centrais (SILVA et al., 2012).

Além de fonte de proteína, os bovinos eram também usados como força motriz nos engenhos de cana, no transporte e deslocamento dos bandeirantes. Entretanto, devido ao colapso da mineração, a pecuária de corte foi tomando força e se estabelecendo na região central (SILVA et al., 2012). A ascensão do setor com o passar dos anos colocou o país em destaque no mercado da carne, entre os anos de 1990 e 2018 houve um aumento de produtividade em 176% passando de 1,63 arroba/ha/ano para 4,5 arroba/ha/ano (ABIEC, 2019).

A espécie suína chegou ao Brasil inicialmente visando a garantia do sustento com carne e toucinho, e apenas no final do século XIX e início do século XX com a vinda da imigração europeia para os estados do sul e advento do uso de óleos vegetais, os cruzamentos entre raças foram direcionados para uma maior produção de carne. Entre os anos de 1980 e 2012, enquanto o crescimento em produção mundial foi de 110% o Brasil cresceu 200%, principalmente pela evolução genética, nutricional e tecnificação do setor, passando a ser abatidos com maior peso e sem acúmulo de gordura (ABCS, 2014).

Com um rebanho de aproximadamente 22.321.094 cabeças, o estado de Minas Gerais destaca-se como um dos 3 maiores estados produtores de carne bovina, junto com os estados de Goiás e Mato Grosso, sendo responsáveis por 35,7% do plantel nacional (IGBE, 2019). Já a carne suína produzida no estado mineiro ocupa o quarto lugar, com cerca de 11,16%, atrás apenas dos estados pertencentes a região sul do país (ABPA, 2020).

Atualmente, o Brasil possui notoriedade mundial quanto a produção de carnes, a qual no ano de 2019 foi equivalente a 3,9 e 10,2 milhões de toneladas de carne suína e bovina, respectivamente (ABPA, 2020). Neste mesmo ano, o consumo

nacional médio de carne bovina foi de 38,3 kg per capita e suíno de 15,3 kg per capita. Quanto aos índices de exportação, o Brasil ocupa o 1º lugar para carne de origem bovina e 4º lugar para carne de origem suína (ABIEC, 2020; EMBRAPA, 2020).

Em virtude da expressividade econômica do mercado da carne bovino e suíno, é necessário entender as etapas envolvidas na obtenção da carne, bem como os patógenos envolvidos para que haja a garantia de oferta de produtos seguros visando a integridade de seus consumidores.

2. Relação entre contaminação e carne bovina e suína

A carne é um dos alimentos mais nutritivos utilizados na alimentação humana, pois possui natureza proteica de alta qualidade, fonte de energia e nutrientes. Por se tratar de um alimento extremamente completo, favorece a sobrevivência e multiplicação de bactérias sejam elas patogênicas ou deteriorantes (MARQUES et al., 2005; BONESI & SANTANA, 2008).

Atribuindo ao fato que *E. coli* têm como habitat primário o intestino de animais de sangue quente, a eliminação do patógeno ocorre principalmente pelas fezes (ERCUMEN et al., 2017). Assim, durante as etapas de pré-abate, os animais podem ficar estressados, fazendo com que ocorra uma maior liberação de material fecal e consequentemente de patógenos (BARHAM et al., 2002). Já no abatedouro os pontos críticos ocorrem durante a etapa de esfolagem (retirada da pele) em bovinos e quando há contato acidental do conteúdo gastrointestinal em bovinos e suínos (PENNEY et al., 2007). Uma vez presente na carcaça contaminada, este microrganismo pode se disseminar através do manuseio dos manipulares e somado com o abuso das temperaturas no frigorífico e/ou varejo, podem contribuir para a multiplicação de patógenos no produto final, apresentando risco à saúde dos consumidores (WAMBUI et al., 2018; ALEXANDER et al., 2010).

Com o intuito de reduzir ou eliminar *E. coli* do produto a ser ofertado, a indústria da carne tem se empenhado para manter a qualidade e segurança por meio das Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASHEARS & CHAVES, 2017) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) por meio da Portaria nº 46/1998. A ANVISA instituiu mediante a RDC nº 275/2002, o Regulamento Técnico de Procedimentos

Padronizados Aplicados aos Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos e Lista de Verificação de BPF, pela Portaria nº368/1997, visando a garantia e aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na Inspeção Sanitária em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos em todo o Brasil (ANVISA, 2002).

Além das exigências previstas pela ANVISA e pelo Ministério da Saúde, as etapas de padronização do processo abate foram atualizadas de acordo com as particularidades de cada espécie e estão descritas pelo decreto nº 9.013/2017 do Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento - MAPA, o qual regulamenta as normas sobre Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017).

Tendo em vista o impacto causado pela presença de *E. coli* nos produtos cárneos bovinos, no ano de 2015 a norma interna DIPOA/SDA de nº 1 de 17 de junho, instituiu o Programa de pesquisa de *E. coli* verotoxigênica em carne bovina, estabelecendo a pesquisa dos sorogrupos O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BRASIL, 2015).

A contaminação cruzada também pode ocorrer nas etapas subsequentes ao abate animal, através do contato com um produto cru, mãos, superfícies e utensílios (ABDISSA et al., 2019), como demonstrado no estudo de Warriner et al (2002) em que avaliaram a circulação de um clone de *E. coli* isolado de uma carcaça suína equipamentos e ambiente, apresentando claramente a contaminação cruzada que pode ocorrer. Um produto bastante manipulado e processado que também merece atenção é a carne moída, pelo fato de estar envolvida em diversos surtos alimentares envolvendo cepas diarreiogênicas, inclusive O157:H7 (CURRIE et al., 2019; TORO et al., 2015).

3. Epidemiologia de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) no Brasil.

No Brasil, os surtos são notificados de maneira compulsória, preconizada na Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016). Dados do Ministério da Saúde demonstram que entre 2009 e 2018 cerca de 85% dos surtos alimentares foram causados por diversas bactérias, sendo *E. coli* o principal agente reportado. Entre os

alimentos envolvidos, a carne bovina e suína representou 5,3% e 2,0%, respectivamente (SVS/MS, 2019). Em outros países como Estados Unidos a espécie *E. coli*, patótipo STEC terceiro agente mais relacionado a surtos entre os anos de 2016 a 2019 (TACK, 2020). Além do alimento cárneo, Bühler e colaboradores (2014) enfatizam que fatores como sazonalidade e saneamento básico também estabeleçam uma relação direta com o número de internações e óbitos causados por DEC, o que justifica o maior número de casos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Historicamente as DEC estão presentes há anos na sociedade. Um exemplo são os diversos casos de diarreia causada pelo patótipo EPEC na década de 1980, sendo responsável por cerca de 30% dos casos em crianças, e apresentado os sorogrupos O111, O55 e O119 como os mais recorrentes (GOMES et al., 1991). Já na década de 1990 diversos estudos epidemiológicos apontaram que os patótipos mais prevalentes foram EPEC atípica e EAEC (SPANO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; ORLANDI et al., 2006; FRANZOLIN et al., 2005) os quadros apresentados de diarreia aguda tiveram ocorrência tanto em crianças como em adultos (HERNANDES et al., 2009). STEC, ETEC e EIEC são os patótipos diarreiogênicos menos notificados em estudos brasileiros (FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007).

O primeiro relato de caso no Brasil com associação entre o sorotipo O157 e doença em humanos ocorreu no ano de 2002, o patógeno foi isolado de três pacientes apresentando diarreia severa sanguinolenta (IRINO et al., 2002). Neste mesmo ano, também houve o caso de uma criança que apresentou SHU e diarreia aguda, a cepa isolada era pertencente a outro sorogrupo, o O26:H11 (GUTH et al., 2002). Na Bahia, Franzolin et al. (2005), isolou 30 cepas de DEC, sendo os patótipos mais frequentemente identificados aEPEC (10,1%), seguido de ETEC (7,5%) e EAEC (4,2%). Entre 2011 e 2016 Ori et al., (2018) avaliou isolados de *E. coli* referentes a 5.047 casos de infecção humana no estado de São Paulo, incluindo dois casos de SHU, o patótipo mais frequente foi EPEC, encontrado em 359 (52,6%) dos casos de DEC positivos, seguido de EAEC presente em 222 (32,5%) dos casos. ETEC, EIEC e STEC foram identificados em 43 (6,3%), 30 (4,4%) e 29 (4,2%) dos casos positivos, respectivamente.

Escherichia coli teve sua primeira descrição no ano de 1885 pelo médico Theodor Escherich, um período historicamente conhecido como “Idade do ouro da bacteriologia”. Inicialmente foi denominada como *Bacillus coli imune*, e em 1958 recebeu a nomenclatura usada atualmente (FRIEDMANN, 2014). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Escherichia* possui diversas espécies, dentre elas *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* e *Escherichia coli*, sendo *E. coli* a de maior destaque (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

E. coli se caracterizam por serem bastonetes, Gram-negativos, não esporulado, a maioria das espécies possuem motilidade devido à presença de flagelos peritríquios, se trata de um microrganismo mesófilo com temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C e pH ideal entre 7 e 7,5, além disso, possuem a capacidade de formar biofilme (TORTORA et al., 2012). Em relação ao metabolismo, são aeróbios facultativos, podendo obter energia por meio de respiração ou fermentação, possuem a capacidade de fermentar glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose resultando na produção de glicose e ácido (QUINN et al., 2005; FORSYTHE, 2013).

O isolado deste microrganismo ocorre em meios de cultura contendo lactose em sua composição ou naqueles contendo componentes fluorogênicos com intuito de avaliar a presença de D-glucoronidase, como caldo Lauril Triptose e Caldo EC ou ainda, ágar (MacConkey ou Ágar Eosina Azul de Metileno- EMB) (NATARO E KAPER, 1998). Para confirmação, são realizados testes bioquímicos, como o conjunto contendo os meios EPM, MILi e Citrato de Simons, avaliando a presença de gás, sulfeto de hidrogênio, hidrólise da ureia, glicose, triptofano, motilidade, indol, descarboxilação da lisina e utilização do Citrato ou IMViC – Indol, Vermelho de Metila, Vogues Proskauer e Citrato. De acordo com o perfil de crescimento do patógeno em cada bioquímico, podemos presumir ser ou não *Escherichia coli* (MARTINS et al., 1992; TOLEDO et al., 1982a; TOLEDO et al., 1982b).

Devido sua facilidade de colonização e adaptação aos hospedeiros, este microrganismo é considerado um dos patógenos bacterianos mais versáteis. Seu reservatório natural é o intestino do homem e animais. Após a colonização inicial, logo nos primeiros dias de vida humana, esta bactéria desempenha um papel favorável na

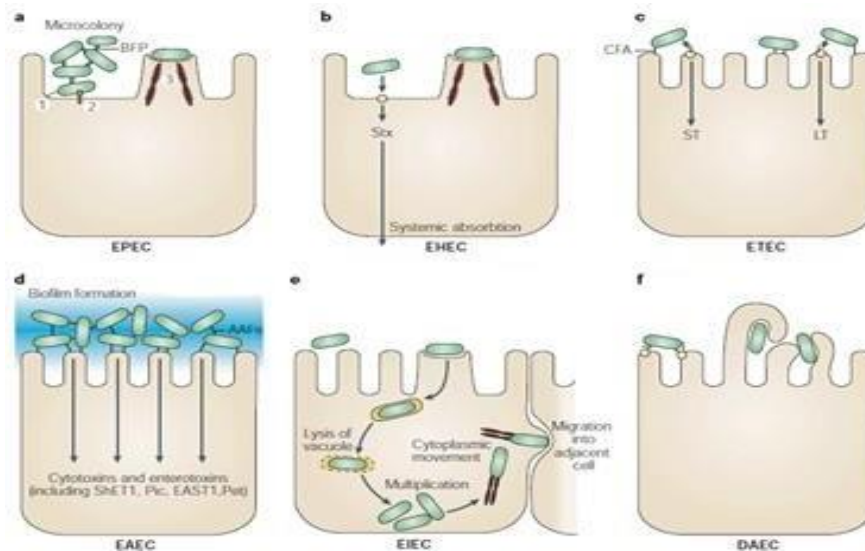
síntese de vitaminas e proteção contra bactérias nocivas (TADDEI et al., 2017). Porém, algumas delas são capazes de causar infecções no trato gastrointestinal, denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) ou com afecções extra intestinais (ExPEC), atingindo trato urinário e meninge, mediante ativação de fatores de virulência (MENG et al., 2007).

A eliminação pelas fezes, caracteriza a sua principal fonte de contaminação e transmissão, podendo ocorrer de forma direta via fecal-oral, ou indireta pela da água, solo e alimentos (ERCUMEN et al., 2017). Estas vias de contaminação podem ser responsáveis por causar surtos envolvendo alimento com a presença destas cepas patogênicas ao homem (OLIVEIRA et al., 2010).

Os fatores de virulência envolvidos na patogenicidade de *E. coli* são multifatoriais e complexos, envolvendo a presença de adesinas, lipopolissacarídeos (LPS), hemolisinas (α e β), toxinas como as do tipo *Shiga* (stx1 e stx2), fatores necrosantes citotóxicos (CNF1 e CNF2) e enterotoxinas (STa, STb, LT1 e LT2) (HIRSH & ZEE, 2013). Estes genes também podem ser móveis, como os plasmídeos, ilhas de patogenicidade (PAI), transposons e bacteriófagos, com potencial de serem transferidos entre bactérias do mesmo ou de diferentes gêneros, resultando em novas combinações de genes de virulência ou transferindo este material para uma bactéria até então não patogênica (KAPER et al., 2004).

Baseado nos fatores de virulência, mecanismos de adesão na célula hospedeira, sorotipo O:H, manifestações clínicas e fatores epidemiológicos, os grupos de *Escherichia coli* diarreiogênicas são subdivididos em seis patótipos (Figura 1) representados por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) típica ou atípica, *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) e *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC) (NATARO E KAPER, 1998; CROXEN et al., 2013).

Figura 1: Patótipos de *E. coli* diarreiogênicas e seus principais mecanismos de virulência conforme KAPER et al., (2014).



Fonte: Clermont et al., 2013.

3.1 *E. coli* enterotoxigênica - ETEC

Também conhecidas como *E. coli* produtora de enterotoxinas, ETEC são descritas como bactérias colonizadoras da superfície da mucosa do intestino delgado, através da adesão com a célula hospedeira por fímbrias (CROXEN et al., 2013). São capazes de produzir toxinas termolábeis (LT), termoestáveis (ST), ou ambas. O mecanismo responsável por causar o quadro típico é resultante da causa do aumento de monofosfato guanilato cíclico (cGMP) intracelular, além do aumento da proteína quinase II cGMP dependente (cGKII), esta quinase é responsável pela fosforilação e ativação dos canais de cloreto (CFTR), com isso ocorre a diminuição da absorção de sódio e cloreto pelas células absortivas e a secreção de ânions pelas células da cripta (FOSTER & SMITH, 2009).

O quadro clínico apresenta diarreia aquosa, devido ao desequilíbrio hidroeletrólítico, podendo ser acompanhado de febre baixa e desidratação (ISIDEAN et al., 2011). Esta enfermidade também é conhecida como diarreia dos viajantes, normalmente relatada nos países em desenvolvimento, com maior prevalência de morbidade e mortalidade de crianças. Além dos seres humanos, a produção animal

também é afetada, já que a diarreia em leitões e em bezerros são responsáveis por causar elevados índices de mortalidade e morbidade (CROXEN et al., 2013; NAGY & FEKETE, 2005).

3.2 *E. coli* enteroinvasiva - EIEC

Em 1944, EIEC foi descrita pela primeira vez como “bacilo paracólon”, e posteriormente denominada como *E. coli* O124, e associada aos seguintes sorotipos: O28ac: NM, O29: NM, O112ac: NM, O121: NM, O124: NM, O124: H30, O135: NM, O136: NM, O143: NM, O144: NM, O152: NM, O159: H2, O159: NM, O164: NM, O167: H4, O167: H5, O167: NM e O173: NM (JAFARI et al., 2012). Estes antígenos possuem grande semelhança ou idênticos a alguns presentes em *Shigella spp.* (LAN et al., 2004). Na década de 1940, *Shigella spp.* foi separado do grupo das *E. coli*, por apresentar algumas características clínicas diferentes, como a capacidade de causar síndrome urêmica hemolítica e trombocitopenia, apesar disso, estes gêneros apresentam grande correlação bioquímica, genética e patogenética (UD-DIN & WAHID, 2014). E por essa razão, EIEC pode estar subestimada em levantamentos epidemiológicos, com poucos surtos notificados relacionados a este patótipo (CROXEN et al., 2013).

Em relação ao mecanismo de patogenia, EIEC pode causar colite inflamatória invasiva, e ocasionalmente desinteria (MORENO et al., 2012). O quadro geral de diarreia secretória ocorre através da penetração das células intestinais (mediada pelo gene *fliC* e proteínas de invasão - *lpa*), multiplicação no vacúolo endocítico e disseminação lateral para células adjacentes pela nucleação de microfilamentos de actina (MENG et al., 2007; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Esta invasão celular estimula a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela destruição e inflamação do tecido afetado (NATARO; KAPER, 1998).

3.3 *E. coli* enteropatogênica - EPEC

E. coli enteropatogênica (EPEC) é descrita como um dos principais agentes causadores de diarreia principalmente em crianças de zero a cinco anos, em âmbito

mundial, com destaque em países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2008; LANATA et al., 2013).

O mecanismo de patogenicidade ocorre inicialmente pela adesão íntima aos enterócitos do intestino delgado, causando a destruição das microvilosidades, induzindo a lesão característica *attaching and effacing* (A/E) com a translocação de proteínas de secreção do tipo III e formação de pedestais (CHEN & FRANKEL, 2005). A ligação entre bactéria e célula hospedeira é mediada por uma proteína chamada intimina, codificada pelo gene *eae*, presentes em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocycle effacement*). Esses distúrbios do citoesqueleto são acompanhados por uma resposta inflamatória culminando em náuseas, febre e diarreia aquosa, além da má absorção de nutrientes causado pelo desarranjo celular (HE et al., 2015).

Conforme definido no Simpósio Internacional de EPEC no ano de 1995, este patótipo pode ser dividido em dois grupos: A EPEC típica (tEPEC), possui um plasmídeo de virulência conhecido como EAF (EPEC *adherence factor*) que codifica a aderência em células epiteliais através da formação de pilus formador de feixe, mediadas pelo BFP (*bundle-forming pili*) e a EPEC atípica (aEPEC), que não possui esse plasmídeo (KAPER, 1996; FRANKEL et al., 1998). Além disso as cepas tEPEC são patogênicas para humanos e não são encontradas em animais, enquanto as cepas aEPEC são patogênicas para ambos (TOZZOLI et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, são reconhecidos doze grupos sorológicos clássicos em O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987). Outros fatores de virulência já foram encontrados em outros sorogrupos, por isso atualmente são considerados fenótipo e genótipo, em conjunto, para a identificação do patótipo (OCHOA et al., 2008; ARAUJO et al., 2007).

3.4 *E. coli* difusamente aderente - DAEC

DAEC é um patótipo composto por cepas que exibem um padrão de aderência difusa em células HeLa e HEp-2, além de estarem associados a quadros de diarreia aquosa e infecções do trato urinário. Sua ocorrência se dá tanto em países

desenvolvidos quanto em desenvolvimento, com maior incidência em crianças de 18 meses a 5 anos, apesar de já terem sido relatados em crianças mais velhas e adultos (SCALETSKY et al., 2002; CROXEN & FINLAY, 2010).

As cepas de DAEC induzem um efeito citopático que é caracterizado pelo desenvolvimento de longas projeções celulares, semelhantes a dedos, envolvendo as bactérias aderidas (BERNET-CAMARD et al., 1993). Apesar deste padrão genotípico ser o responsável por caracterizar DAEC, ele também pode ser observado em outras *E. coli* diarreiogênicas, como EPEC (BOUZARI et al., 2000). Por isso, outros métodos alternativos são usados na confirmação do patótipo, como a verificação da presença dos genes de adesão *daa*, *afa* e *dr* (LE BOUGUÉNEC & SERVIN, 2006).

3.5 *E. coli* enteroagregativa - EAEC

EAEC é conhecida por causar doenças endêmicas e epidêmicas em todo o mundo, este patótipo é relatado como a segunda causa mais recorrente da diarreia dos viajantes, depois da ETEC com ocorrência tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (PABALAN et al., 2013; HARRINGTON et al., 2006).

A descoberta de EAEC ocorreu de forma semelhante a DAEC, por possuírem um fator de adesão a células HEp-2, porém com um padrão distinto da EPEC (WAKIMOTO et al., 2010). Este fator é conhecido como aderência agregativa (AA) que ocorre pela formação de um empilhamento de bactérias, conhecido também como padrão “tijolo empilhado” (KAUR et al., 2010; NATARO et al., 1987). O fator de regulação mais estudado é o *Aggr*, responsável por controlar os genes de adesão celular, além uma toxina estável ao calor (EAST1) codificada pelo gene *astA*, e *Shigella* enterotoxina 1 (ShET1), semelhante com enterotoxinas de *Shigella* spp. (KAUR et al., 2010, BOUZARI et al., 1994).

A patogênese da EAEC envolve basicamente três estágios: Aderência à mucosa intestinal mediada por fímbrias de aderência agregativa (AAF) e fatores de aderência; Aumento da produção de muco, com formação de biofilme, contribuindo na ligação da bactéria à superfície dos enterócitos; e liberação de toxinas com produção de uma resposta inflamatória, toxicidade da mucosa e secreção intestinal (VILLASECA et al., 2005) resultando em um quadro clínico com a presença de diarreia

aquosa, podendo ser acompanhada de muco e sangue, náusea, vômito e febre baixa (CROXEN et al., 2013).

3.6 *E. coli* produtora de Shiga-toxina/ Enterohemorrágica -STEC/ EHEC

Conhecida como *E. coli* produtora de Shiga Toxina (STEC) também são conhecidas como *Escherichia coli* produtora de verotoxina (VTEC) pelo fato de causarem efeito citopático em células Vero. (NATARO & KAPER, 1998; KARMALI, 1989). Inicialmente, o termo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) surgiu para nomear amostras O157:H7, mas atualmente sabe-se que EHEC é um subconjunto de STEC e inclui uma conotação clínica que não está implícita e este grupo. Isto ocorre porque nem todas as cepas STEC são consideradas patogênicas, o fato de possuírem uma ou mais toxinas do tipo *stx* não garante sua expressão, enquanto que todas as cepas EHEC são consideradas patogênicas, responsáveis por causar colite hemorrágica (HC), Síndrome urêmica-hemolítica (HUS), expressar o gene *stx* e causar lesões A/E (*attaching and effacing*) em células epiteliais (SADIQ, et al., 2014; LEVINE & EDELMAN, 1984).

As toxinas Shiga são os principais fatores de virulência de STEC, responsável pelas principais manifestações da colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (PATON & PATON, 1998; TARR et al., 2005). São divididas em dois grupos antigênicos com cerca de 55% de homologia entre seus aminoácidos. Em relação aos subtipos, grupo *stx1* é mais homogêneo, composto por três variantes: *stx1a*, *stx1c* e *stx1d*. Já o grupo *stx2* possui maior diversidade: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* e *stx2g*, relacionando a um elevado nível de toxicidade, são mais frequentemente associadas ao SHU (FOCACCIA, 2005).

Estas toxinas são produzidas no cólon, absorvidas pelo epitélio intestinal até alcançar a corrente sanguínea e aos receptores Gb3. Estes receptores são mais encontrados em células endoteliais do rim, intestino e cérebro (GUTH, 2008). Nos rins, essa toxina é responsável por causar necrose, resultando lesões que podem levar a SHU, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia, e consequentemente falência renal aguda. Toxina Shiga também é responsável por provocar lesões no cólon, podendo resultar em diarreia sanguinolenta, podendo vir a ocorrer

complicações como, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal (KAPER et al., 2004).

O mecanismo de virulência de cepas STEC LEE positivas às células hospedeiras ocorre através da interação intimina e *Tir* (*Translocated intimin receptor*), como ocorre nas EPEC dando origem a uma lesão do tipo A/E (NATARO & KAPER, 1998). Doenças humanas como CH e SHU são associadas a enterohemolisina (Ehx) codificada pelo gene *hly* responsável pela formação de poros e lise de eritrócitos (RIVAS, et al., 2006; FAGAN et al., 1999; SCHDMIT et al., 1999).

Em relação a sua composição antigênica, os soropatótipos são divididos em cinco grupos de A a E, de acordo com a ocorrência em casos de doenças em humanos. O soropatótipo A é composto por 10 sorotipos de O157:H7 e 3 O157: NM (Não Móvel). Soropatótipo B compostos por 3 cepas cada um dos sorotipos O26:H11, O103:H2, O111: NM, O121:H19 e O145: NM. Soropatótipo C com 4 cepas de sorotipos O91:H21 e O113:H21 e oito cepas de outros sorotipos. Soropatótipo D com 14 cepas associadas somente a presença de diarreia sem evolução para HUS, e o soropatótipo E que é composto por cepas de STEC em animais sem relação com doenças em humanos (KARMALI et al., 2003).

E. coli O157 ficou conhecida como sorotipo enterohemorrágico de maior importância em saúde pública no ano de 1982, após a ocorrência de um grande surto envolvendo hambúrgueres contaminados em uma famosa rede de *fast-food* americana e desde então, vêm sendo associado a morbidade e mortalidade em países industrializados (RANGEL et al., 2005; RILEY, et al., 1983). Responsável pela alta prevalência em países desenvolvidos, dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), apontam que o sorotipo O157:H7 esteve no *ranking* das afecções responsáveis por causar infecções em humanos, com 42,7% de acometimento (CDC, 2016). Dados estimados sugerem que cerca de 5 a 10% das pessoas infectadas com O157:H7 possam desenvolver a HUS, sendo mais prevalentes em crianças de até 5 anos de idade, idosos e imunossuprimidos (CDC, 2018). Já no Brasil, há poucos dados consolidados envolvendo a investigação de surtos com HUS, devido a falhas no isolamento do patógeno, na notificação dos casos e de um sistema de vigilância adequado (EDUARDO et al., 2002).

Além de O157, outros sorogrupos de STEC podem causar infecções no trato gastrointestinal, ocasionando doenças graves em humanos: O26, O45, O103, O111, O121 e O145, também conhecidos como *big six* (JOHNSON et al., 2006). Estes sorogrupos não-O157 podem variar em relação a sua prevalência, de acordo com a região geográfica, sendo mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil (GUTH, 2008).

Um levantamento realizado com pacientes humanos apresentando diarreia persistente, no Estado de São Paulo, demonstrou que os sorotipos mais encontrados foram: O26:H11, O55:H19, O93:H19, O111:NM, O11:H11, O118:H16 e O157:H7 (VAZ et al., 2004), anos mais tarde Cergole-Novella, et al. (2006) demonstrou que mais prevalente em seu estudo era O111, seguido de O26. Em suma, as infecções causadas por STEC em nosso país estão associadas a diarreia não sanguinolenta, sobretudo em crianças e sem apresentação de maiores complicações (IRINO et al., 2002).

Estudos epidemiológicos afirmam que grande parte dos surtos envolvendo STEC ocorrem por via alimentar, através do consumo de produtos cárneos contaminados (BARTH et al., 2016). O bovino é o principal reservatório do patógeno na cadeia alimentar, apresentando-se assintomáticos (SODERLUND et al., 2016; MENGE, 2020). No entanto, este patógeno também foi isolado de carnes e subprodutos de suínos, caracterizando também esta espécie como elemento chave na transmissão de STEC (CONEDERA et al, 2007; TROTZ-WILLIAMS et al., 2012; CHA et al, 2018).

Este patótipo apresenta um grande impacto em suas múltiplas áreas de estudos, uma vez que abrange os temas compreendidos na Saúde Única envolvendo o âmbito animal (reservatórios), ambiental (solo, água, ambiente de abate, fômites), e humanos (epidemiologia e saúde pública) (CROXEN et al., 2013).

4. Grupos filogenéticos - Classificação segundo Clermont

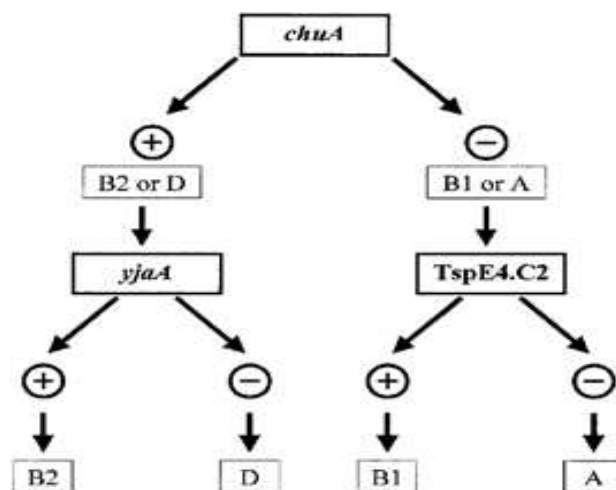
O genoma de *E. coli* detém cerca de 10.000 genes, por combinação gênica essa ampla variedade pode acarretar no surgimento de diversos fenótipos (CLERMONT et al., 2011). Neste caso, a filogenia pode ser aplicada com a finalidade

de diferenciar patógenos de acordo com as similaridades genéticas apresentadas entre eles. Ou seja, evidenciar se estes microrganismos pertencem a uma mesma ancestralidade clonal, compartilhando os mesmos mecanismos de patogenicidade e/ou epidemiologia (CLERMONT et al., 2013).

Nos anos 2000, um grupo de pesquisadores desenvolveram um PCR *triplex* para a detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* como marcadores filogenéticos (CLERMONT et al., 2000). Esta técnica era capaz de identificar 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D que se diferem em relação a patogenicidade, hospedeiro, metabolização de açúcares (CLERMONT et al., 2008; ESCOBAR-PARAMO et al., 2006; JOHNSON et al., 2005).

Lecointre et al., 1998 teria evidenciado a presença do gene *chuA* nos grupos B2 e D, que possivelmente adquiriram este gene de um ancestral comum, bastante vinculados a cepas patogênicas, já os grupos A e B1 não possuíam este gene e são associados a cepas comensais (CLERMONT, BONACORSI & BINGEN, 2000). A diferenciação entre grupo B2 e D foi feita pelo gene *yjaA*, presente em todos os isolados do grupo B2 e ausentes no grupo D. E por fim, o gene *TspE4.C2* presente no grupo B1 e ausente no grupo A. Os resultados das 3 amplificações permitiram o estabelecimento da primeira árvore decisória para determinação do grupo filogenético (Figura 2) (GORDON et al., 2008; CLERMONT et al., 2011).

Figura 2: Árvore filogenética de acordo com Clermont et al., 2000.



Após 13 anos do desenvolvimento do PCR *triplex*, com o advento de novas tecnologias de biologia molecular, aprofundamento do conhecimento da estrutura genômica de *E. coli* e uso de MLST, foram propostas modificações no protocolo.

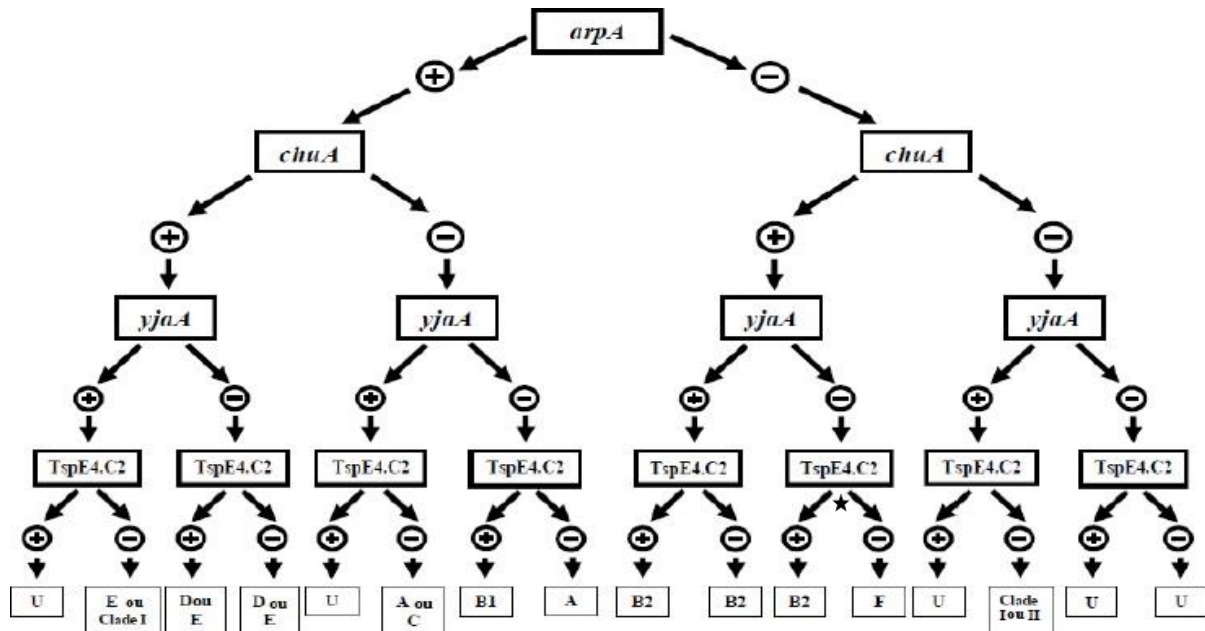
Nesta nova classificação foram incluídos dois genes: *arpA* e *trpA*, com isso, deu-se origem a novos grupos: C, E, F e Clado I (CLERMONT et al., 2013). O grupo C apresenta forte correlação com B1, porém características distintas permitiu que houvesse uma separação entre estes grupos (MOISSENET et al., 2010). Enquanto grupos E e F são virulentos e responsáveis por causar doenças extra intestinais, além disso, o grupo E tem como melhor representante *E. coli* O157:H7, anteriormente classificada como grupo D (TENAILLON et al., 2010). Cepas de *E. coli* classificadas como Clado I, de acordo com Walk, et al (2009), possuem características genotípicas distintas de todos os outros isolados da espécie por possuírem um alto grau de recombinação.

Em suma, associações envolvendo os filogrupos indicam que normalmente as cepas ExPEC pertencem aos grupos B2, E, F e D, as cepas comensais aos grupos A e B1, enquanto as cepas DEC pertencem aos grupos A, B1, D e E (Köhler et al., 2011; Sarowska, et al., 2019; Baldy-Chudzik et al., 2008).

Trabalhos mais recentes vêm surgindo com o intuito de ajustar esta classificação, assim como a publicação mais recente de Clermont et al. (2019) a qual caracterizou o grupo G, sendo este um intermediário entre os filogrupos B2 e F. Esta metodologia de agrupamento trabalha com características que se diferem na questão metabólicas, na presença de genes de virulência e também nos perfis de resistência aos antibióticos (Clermont et al., 2019). Devido às facilidades em sequenciamento do genoma completo, tipagem de sequenciamento *multilocus* (MLST) e eletroforese enzimática *multilocus* (MLEE), outras propostas de classificação em diferentes clados filogenéticos vêm sendo propostas, assim como o estudo de Abram et al., 2021 com a proposta de diferenciação em 14 filogrupos distintos.

Para compreender a distribuição bacteriana, Clermont e colaboradores estabeleceram a divisão em grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F, G e Clado I estabelecidos conforme a árvore decisória na figura 3.

Figura 3: Atual interpretação dos resultados de PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* de acordo com Clermont et al., 2013.



Fonte: Silva.,2015.

* O patótipo G é evidenciado pela distinção entre os patótipos B2 e F com uso dos genes *ybgD* e *cfaB*

REFERÊNCIAS

ABCS, 2014 - Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: teoria e prática** (1ª Edição). ABCS, Brasília, DF, p. 908, 2014.

ABDISSA, R.; HAILE, W.; FITE, A. T; BEYI, A. F.; AGGA, G.E.; EDAO, B. M.; TADESSE, F.; KORSÄ, M. G.; BEYENE, T.; BEYENE T. J.; de ZUTTER, L.; COX, E.; GODDEERIS, B.M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle at slaughter and beef carcasses at retail shops in Ethiopia. **BMC Infectious Disease**, v. 17, p. 277, 2017.

ABIEC, 2019 - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil 2019**. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/> Acesso em: 06 out. 2020.

ABIEC, 2020 - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil 2020**. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/> Acesso em: 06 out. 2020.

ABPA, 2020 - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2020**. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf Acesso em: 06 out. 2020.

ABRAM, K.; UDAONDO, Z.; BLEKER, C.; WANCHAI, V.; WASSENAAR, T. M.; ROBESON, M. S. Mash-based analyses of *Escherichia coli* genomes reveal 14 distinct phylogroups. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 117, 2021.

ALEXANDER, T. W., INGLIS, G. D., YANKE, L. J., TOPP, E., READ, R. R., REUTER, T., & MCALLISTER, T. A. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 40–48, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada-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 em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fc_e9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254. Acesso em: 28 jan. 2021.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.3396–3399, 2007.

BALDY-CHUDZIK, K., MACKIEWICZ, P., & STOSIK, M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 173–184, 2008.

BARHAM, A. R.; BARHAM, B. L.; JOHNSON, A. K.; ALLEN, D. M.; BLANTON, J. R.; MILLER, M. F. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 280–283, 2002.

BARTH, S. A.; MENGE, C.; EICHHORN, I.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; PICKARD, D.; BELKA, A.; BERENS, C.; GEUE, L. The accessory genome of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* defines a persistent colonization type in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5455–5464, 2016.

BERNET-CAMARD, M. F.; COCONNIER, M. H.; HUDAULT, S.; SERVIN, A. L. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1918–1928, 1996.

BONESI, G. L. & SANTANA, E. H. W. Fatores tecnológicos e pontos críticos de controle de contaminação em carcaças bovinas no matadouro. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 39-46, 2008.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; FARHOUDI-MOGHADDAM, A. A.; SHOKOUHI, F.; PARSI, M. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 95–97, 1994.

BOUZARI, S.; JAFARI, M. N.; SHOKOUHI, F.; PARSI, M.; JAFARI, A. Virulence-related DNA sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 89–93, 2000.

BRASHEARS, M. M. & CHAVES, B. D. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. **Meat Science**, v. 132, p. 59-71, 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Norma interna DIPOA/DAS nº 1 de 17 de junho de 2015**. Aprova os procedimentos para a coleta e análise de *Escherichia coli* verotoxigênica e *Salmonella* spp. em carne de bovino in natura utilizada na formulação de produtos cárneos, cominutados, prontos para serem cozidos, fritos ou assados, Brasília 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/control-de-patogenos/arquivos-control-de-patogenos/E.coliNormaInterna1de2015ProgramadeEcoliverotoxigenica1706.pdf> Acesso em: 28 jan. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC, nº 204, de 17 de fevereiro de 2016**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html Acesso em: 28 jan. 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, Brasília 2017. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-publicacaooriginal-152253-pe.html> . Acesso em: 28 jan. 2021.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

BÜHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A. S.; HACON, S. S. Análise espacial de indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, 2010. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 9, p. 1921-1934, 2014.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 289–311, 2005.

CASTRO, V.S.; CARVALHO, R.C.T.; CONTE-JUNIOR, C.A.; FIGUEIREDO, E.E.S. Shiga-Toxin producing *Escherichia coli*: pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.16, p.1269–1280, 2017.

CDC, Center for Disease Control. National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Annual Report, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/surv2016/index.html> Acesso em: 28 jan. 2021.

CDC, Center for Disease Control. *E. coli* and Food Safety, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/ecoliinfection/index.html> Acesso em: 28 jan. 2021.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; DE CASTRO, A. F.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 2, p. 234–239, 2006.

CESTARI, S. E.; SCHUOFF, P. A.; LIMA, N. R.; BURGOS, T. N.; DAMBROZIO, A. M. L.; PELAYO, J. S. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 15, n. 2, p. 139-143, 2016.

CHA, W.; FRATAMICO, P. M.; RUTH, L. E.; BOWMAN, A. S.; NOLTING, J. M.; MANNING, S. D.; FUNK, J. A. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 8–15, 2018.

CHEN, H. D. & FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.1, p. 83–98, 2005.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, O.; LESCAT, M.; O'BRIEN, C. L.; GORDON, D. M.; TENAILLON, O.; DENAMUR, E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 1000–1006, 2008.

CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M.; GLODT, J.; PICARD, B.; OSWALD, E.; DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds, **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654-662, 2011.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CONEDERA, G.; MATTIAZZI, E.; RUSSO, F.; CHIESA, E.; SCORZATO, I.; GRANDESSO, S.; BESSEGATO, A.; FIORAVANTI, A.; CAPRIOLI, A. A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 2, p. 311–314, 2007.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 26, p. 822–880, 2013.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n.1, p. 26–38, 2010.

CURRIE, A.; HONISH, L.; CUTLER, J.; LOCAS, A.; LAVOIE, M. C.; GAULIN, C.; GALANIS, E.; TSCHETTER, L.; CHUI, L.; TAYLOR, M.; JAMIESON, F.; GILMOUR, M.; MUTTI, S.; MAH, V.; HAMEL, M.; MARTINEZ, A.; BUENAVENTURA, E.; HOANG, L.; PACAGNELLA, A. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Mechanically Tenderized Beef and the Largest Beef Recall in Canada, 2012. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 9, p. 1532–1538, 2019.

DOYLE, MICHAEL P.; BUCHANAN, ROBERT L. Food Microbiology: **Fundamentals and Frontiers**. 3. ed. New York: Asm Press, 2007.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M. Síndrome hemolítico-urêmica normas e instruções. **Secretaria de Estado da Saúde, 2002**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-a-lexandrevrancjac/> . Acesso em: 28 jan. 2021.

ELDER, R.; KEEN, J.; SIRAGUSA, G.; BARKOCY-GALLAGHER, G.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W. Correlation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Prevalence in Feces, Hides, and Carcasses of Beef Cattle during Processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

EMBRAPA, 2020 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/2018+-+Consumo+brasileiro+de+carnes+e+ovos+per+capita.png/6dff77f9-c729-ca91-4f2d-b7d7451d23eb?t=1558380428258>>. Acesso em: 14 jan.2020.

ERCUMEN, A.; PICKERING, A. J.; KWONG, L. H.; ARNOLD, B. F.; PARVEZ, S. M.; ALAM, M.; SEN, D.; ISLAM, S.; KULLMANN, C.; CHASE, C.; AHMED, R.; UNICOMB, L.; LUBY, S. P.; COLFORD, J. M. JR. Animal feces contribute to domestic fecal contamination: evidence from *E. coli* measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 15, p. 8725–8734, 2017.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; LE MENAC'H, A.; LE GALL, T.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; SKURNIK, D.; DENAMUR, E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1975–1984, 2006.

FAGAN, P. K.; HORNITZKY, K. M. A.; BETTELHEIM, K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Detection of Shiga-like Toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *ehxA*) genes in animal feces by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 868-872, 1999.

FAO, Food and Agriculture Organization. 2005. **Code of Hygienic Practice for Meat.** (CAC/RCP 58–2005). Codex Alimentarius, FAO, Rome.

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, p. 182, 1996.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

FRIEDMANN, H. C. Escherich and *Escherichia*. **EcoSal Plus**, v. 6, n. 1, 2014.

FOCACCIA, R. V. **Tratado de Infectologia.** Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p. 984-989.

FORSYTHE, STEPHEN J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p.13-36, 2009.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 911–921, 1998.

GOMES, T. A.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A.; GUTH, B. E.; CANDEIAS, J. A.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 164, n. 2, p. 331-337, 1991.

GONÇALVES, M.A.P. **Microbiota – Implicações na Imunidade e no Metabolismo.** 2014. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 2484-96, 2008.

GUTH, B. E. T.; SOUZA, R. L.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. First Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infect Disease**, v. 8, n. 5, p. 535-536, 2002.

GUTH, B. E. T. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). In: Trabulsi, L. R.; Alterthun, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 271-309, 2008.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

HE, T.; WANG, Y.; QIAN, M.; WU, C. Mequindox resistance and in vitro efficacy in animal-derived *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology** v. 177, p.341-346, 2015.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HIRSH D.C. & ZEE Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p.464, 2003.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Mensal**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 1-8, 2019.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F.; NAVES, Z. V. F.; LARA, R. R.; MARCO, M. E. C.; ROCHA M. M. M.; MOREIRA, T. P.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C. O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 446-447, 2002.

ISIDEAN, S. D.; RIDDLE, M. S.; SAVARINO, S. J. PORTER, C. K. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6167-6178, 2011.

JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102–117, 2012.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI, M. A.; SCHUBERT, S.; PRÈRE, M. F.; PICARD, B.; COLODNER, R.; RAZ, R. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 141–145, 2005.

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 1587–1595, 2006.

KAPER, J.B. Defining EPEC. In: Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Revista de Microbiologia**. v.27, p. 130–133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews of Microbiology**. v. 2, p. 123–140, 2004.

KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 15–38, 1989.

KARMALI, M. A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J. B. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 4930–4940, 2003.

KAUR, P.; CHAKRABORTI, A.; ASEA, A. Enteraggregative *Escherichia coli*: An emerging enteric food borne pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2010, p. 254–259, 2010.

KÖHLER, C. D., & DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011.

LAN, R.; ALLES, M. C.; DONOHUE, K.; MARTINEZ, M. B.; REEVES, P. R. Molecular evolutionary relationship of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5080–5088, 2004.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E. CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 2, p. 185–194, 2006.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DENAMUR, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LEVINE, M. M. & EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, v. 6, p. 31–51, 1984.

MARQUES, J. A, PRADO, I. N, MOLETTA, J. L. Características físico – químicas da carcaça e da carne de novilhas submetidas ao anestro cirúrgico ou mecânico terminadas em confinamento, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1514 – 1522, 2006.

MARTINS, M. T.; RIVERA, I. G.; CLARK, D. L.; OLSON, B. H. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o-nitrophenol-beta-D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3095–3100, 1992.

MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology. Fundamental and Frontiers**. 3. Ed. Washington, D.C; American Society for Microbiology, cap 12, p.249-269, 2007.

MENGE C. The Role of *Escherichia coli* Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 607, 2020.

MOISSENET, D.; SALAUZE, B.; CLERMONT, O.; BINGEN, E.; ARLET, G.; DENAMUR, E.; MÉRENS, A.; MITANCHEZ, D.; VU-THIEN, H. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an

extensive outbreak in a neonatal ward: Epidemiological investigation and characterization of the strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2459–2463, 2010.

MORENO, A. C.; FERREIRA, K. S.; FERREIRA, L. G.; ALMEIDA, S. R.; MARTINEZ, M. B. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 138-141, 2012.

NAGY, B., & FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443–454, 2005.

NATARO, J. P. & KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, 1987.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 9, p. 852–856, 2008.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde. Segurança de Alimentos é responsabilidade de todos. OPAS, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5960:seguranca-dos-alimentos-e-responsabilidade-de-todos&Itemid=875 Acesso em: 02 Jan.2021.

ORI, E. L.; TAKAGI, E. H.; ANDRADE, T. S.; MIGUEL, B. T.; CERGOLLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B.; HERNANDES, R. T.; DIAS, R.; PINHEIRO, S.; CAMARGO, C. H.; ROMERO, E. C.; DOS SANTOS, L. F. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. 1–9, 2018.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507- 517, 2006.

PABALAN, N.; SINGIAN, E.; JARJANAZI, H.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* and acute diarrhea in children: a meta-analysis of South Asian populations. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 597–607, 2013.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PENNEY, N.; BIGWOOD, T.; BAREA, H.; PULFORD, D.; LEROUX, G.; COOK, R.; JARVIS, G.; BRIGHTWELL, G. Efficacy of a peroxyacetic acid formulation as an antimicrobial intervention to reduce levels of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 on external carcass surfaces of hot-boned beef and veal. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 200-203, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 512, 2005.

RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN, AND D. L. SWERDLOW. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States 1982-2002, **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 4, p. 603–609, 2005.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B. R.; HEBERT., R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE. P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n.12, p. 681-85, 1983.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; DEZA, N.; LEOTTA, G. A. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión [The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission]. **Medicina**, v. 66, n. 3, p. 27–32, 2006.

SADIQ, S. M.; HAZEN, T. H.; RASKO, D. A.; EPPINGER, M. EHEC Genomics: Past, Present, and Future. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, 2014.

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

SCALETISKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 645–648, 2002.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P.I.; FROSCHE, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p.115-123, 1999.

SVS/ MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (BR). Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral das Doenças Transmissíveis. **Surtos de doenças transmitidas por alimento no Brasil: Informe 2018.** 2019 fev. Disponível em: <
https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta_o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf> Acesso em: 28 jan. 2021

SILVA, M.; BOAVENTURA, V.; FIORAVANTI, M.; **História do povoamento bovino no Brasil central.** Dossiê Pecuária, p. 34, 2012.

SILVA, V. F. V. **Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água do mar da região costeira do estado de São Paulo, Brasil**, 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SÖDERLUND, R.; HUREL, J.; JINNEROT, T.; SEKSE, C.; ASPÁN, A.; ERIKSSON, E.; BONGCAM-RUDLOFF, E. Genomic comparison of *Escherichia coli* serotype O103:H2 isolates with and without verotoxin genes: implications for risk assessment of strains commonly found in ruminant reservoirs. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 6, p. 30246, 2016.

SPANIO L. C.; SADOVSKY A. D.; SEGUI P. N.; SAICK K. W.; KITAGAWA S. M.; PEREIRA F. E.; FAGUNDES-NETO U.; SCALETSKY I. C. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 359-363, 2008.

TACK, D. M.; MARDER, E. P.; GRIFFIN, P. M.; CIESLAK, P. R.; DUNN, J.; HURD, S.; SCALLAN, E.; LATHROP, S.; MUSE, A.; RYAN, P.; SMITH, K.; TOBIN-D'ANGELO, M.; VUGIA, D. J.; HOLT, K. G.; WOLPERT, B. J.; TAUXE, R.; GEISSLER, A. L. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015-2018. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 16, p. 369-373, 2019.

TADDEI, C. R.; FEFERBAUM, R. Microbiota intestinal no início da vida. ILSI Brasil **International Life Sciences Institute of Brazil**, v. 3, p. 4-32, 2017.

TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and hemolytic uremic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p.1073-1086, 2005.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

TOLEDO, M. R. F.; PONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. 1982a. MILI: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**, v. 13, p. 230-235, 1982.

TOLEDO, M. R. F.; PONTES, C. F.; TRABULSI, L. R., 1982b. EPM: modificação do meio de Rugai e Araujo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glucose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v. 13, p. 309-315, 1982.

TORSO, L. M.; VOORHEES, R. E.; FOREST, S. A.; GORDON, A. Z.; SILVESTRI, S. A.; KISSLER, B.; SCHLACKMAN, J.; SANDT, C. H.; TOMA, P.; BACHERT, J.; MERTZ, K. J.; HARRISON, L. H. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with Restaurant Beef Grinding. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 7, p. 1272-1279, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed 964p. 2012.

TOZZOLI, R.; GRANDE, L.; MICHELACCI, V.; FIORAVANTI, R.; GALLY, D.; XU, X.; LA RAGIONE, R.; ANJUM, M.; WU, G.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p. 3023–32, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TROTZ-WILLIAMS, L. A.; MERCER, N. J.; WALTERS, J. M.; MAKI, A. M.; JOHNSON, R. P. Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. **Canadian Journal of Public Health**, v. 103, n. 5, p. 322–326, 2012.

UD-DIN, A. & WAHID, S. Relação entre *Shigella spp.* e *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e sua diferenciação. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, pág. 1131-1138, dezembro de 2014. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822014000400002&lng=en&nrm=iso>. acesso em 28 de janeiro de 2021.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, Â. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence properties and characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 903- 905, 2004.

VILLASECA, J. M.; HERNÁNDEZ, U.; SAINZ-ESPUÑES, T. R.; ROSARIO, C.; ESLAVA, C. Enterοaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 47, n. 3-4, p. 140–159, 2005.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enterοaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 687–690, 2004.

WALK, S. T.; ALM, E. W.; GORDON, D. M.; RAM, J. L.; TORANZOS, G. A.; TIEDJE, J. M.; WHITTAM, T. S. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6534–6544, 2009.

WAMBUI, J.; LAMUKA, P.; KARURI, E.; MATOFARI, J.; NJAGE, P. Microbial Contamination Level Profiles Attributed to Contamination of Beef Carcasses, Personnel, and Equipment: Case of Small and Medium Enterprise

Slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 4, p. 684–691, 2018.

WHO- World Health Organization. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. **World Health Organization**, Geneva, 1987.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho visa caracterizar o potencial das cadeias de bovinos e suínos, em uma mesma linha de produção como fonte da disseminação de *Escherichia coli* diarreiogênicas entre animais, ambiente de produção, alimentos e humanos. Bem como a avaliação dos principais fatores de patogenicidade e perfil de virulência apresentado por estes isolados.

Objetivos Específicos

- Isolamento de *E. coli* na cadeia produtiva de suínos e bovinos;
- Caracterização das *E. coli* diarreiogênicas- DEC;
- Identificar os grupos filogenéticos nos isolados DEC;
- Determinar os subtipos de toxinas produzidas por cepas *stx* nos isolados DEC;
- Determinar os sorogrupos prevalentes nos isolados DEC;

CAPÍTULO 2. Identification and characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from a mixed cattle and swine's slaughterhouse.

LORENA NATALINO HABER GARCIA

Identification and characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from a mixed cattle and swine's slaughterhouse.

Lorena Natalino Haber Garcia¹, Letícia Roberta Martins Costa², Sthéfany da Cunha Dias², Marcus Vinicius Coutinho Cossi³, Luis Augusto Nero¹, Ricardo Seiti Yamatogi¹

¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV - Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Botucatu, São Paulo, Brazil

³Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

*Correspondence author: Ricardo Seiti Yamatogi, Universidade Federal de Viçosa, Department of Veterinary Medicine, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Cep: 36.570-900; Tel: +55 31 38991472. Email: ryamatogi@ufv.br

ABSTRACT

Escherichia coli is a pathogenic agent distributed worldwide and causes a series of intestinal and extra intestinal infections. Due to the transmission characteristics of this microorganism, several food outbreaks occur annually throughout the world, mainly due to the relationship with animal production chains. Thus, the aim of this study was evaluated pathogenic *E. coli* isolated from mixed slaughterhouse (bovine and swine) in order to verify possible cross-contamination routes between different species slaughtered in the same place. Besides to detect virulence factors, pathotypes, subtypes of Shiga-toxin, phylogroup, serogroup O157, O104 and “big six” serogroup of *Escherichia coli* strains and to determine the association of this isolates with the animal reservoir, sample, and collection points. From 697 isolates confirmed as *E. coli*, 33 were classified as diarrheagenic group, and from this total STEC/ EHEC (n= 21), aEPEC (n=10) and ETEC (n=2). A total of 21 isolates of Shiga-toxin producing were analyzed and classified as: *stx1* (n= 9), *stx2* (n= 11) and for the both genes *stx1* and *stx2* simultaneously (n= 3). Therefore, gene *stx2* was more prevalent than *stx1*, there was no statistical difference between the results (P value < 0.05). Regarding *stx1* subtyping, were classified as *stx1a* (n=7) and *stx1c* (n=1). For *stx2* subtypes was as follows: *stx2b* (n=3), *stx2c* (n=8), *stx2d* (n=8), *stx2f* (n=1) and *stx2g* (n=2). Phylotyping analysis according Clermont methodology demonstrated majority of isolates as group B1. Three EPEC isolates were identified as belonging to serotype O26. PFGE showed a correlation between phylogroups and pathotypes. The results obtained shows that there was no cross-contamination between different species slaughtered in the same place.

Keywords: *E. coli*, diarrhea, molecular epidemiology.

1. Introduction

Escherichia coli is a commensal bacterium in the gastrointestinal tract of mammals, birds and fishes. This microorganism is recognized for its potential to cause disease in humans, being reported in outbreaks in Brazil and around the world. Most of these microorganisms doesn't have pathogenic potential, but a small portion is capable of causing disease in their host's body and are known as diarrheagenic (DEC) when it reaches the intestinal tract or Extra Intestinal (ExPEC) when colonizing the urinary tract or meninges (Vidal et al., 2005; Jang et al., 2017)

Several factors can determine the severity of the infection, factors associated with age, immune status, virulence and pathotype (Jang et al., 2017). The cattle and swine intestinal tract are known as natural reservoir of this pathogen (Karmali et al., 2010; Persad et al., 2014). During slaughter, the carcasses can be cross contaminated by fecal content, and consequently contaminate the handlers and the environment (Croxen et al., 2013). In this case, cross-contamination can occur in animals of different species, since the processing line is the same. Once present in the carcass, this pathogen can reach the final product, causing risk to the final consumer when not properly prepared (Duff et al., 2006), and representing a risk to a public health in all categories as animals, humans and the environment.

Therefore, this study aims to identify the profile of diarrheagenic *Escherichia coli* present in a mixed slaughterhouse of cattle and pigs from different steps of the slaughtering, also from environmental samples as residual water and slaughter surfaces, animal and human feces. In order to evaluate the presence of virulence factors, pathotypes, Shiga toxin characterization genes, serogroup, and the correlation of isolates.

2. Material and Methods

2.1 Sampling:

A total of 697 samples were collected during the slaughtering, in a mixed cattle and swine slaughterhouse, 258 from cattle, 258 from swine and 10 samples of human feces. The samples were collected in different ten sample times at the same abattoir, located in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais State, Brazil. All the animals were sampled after bleeding step, as indicated in the table 1, including the fecal content that

was acquired during the rectus occlusion step. After collection, all of samples were transported to the laboratory under refrigeration until microbiological analysis.

Table 1. Swine, bovine and environment sample collected from different points from a mixed slaughterhouse.

Local	Sample	N	Analytical Unit
Pig Carcass	After bleeding	50	400 cm ²
	After scalding	50	400 cm ²
	After evisceration	50	400 cm ²
	After final wash	50	400 cm ²
Bovine Carcass	After bleeding	50	400 cm ²
	After skinning cattle	50	400 cm ²
	After evisceration	50	400 cm ²
	After final wash	50	400 cm ²
Pig Meat cuts	Loin cup	5	400 cm ²
	Palette	5	400 cm ²
	Leg	5	400 cm ²
	Rump	5	400 cm ²
Bovine meat cuts	Chuck	5	400 cm ²
	Pallet	5	400 cm ²
	Silverside	5	400 cm ²
	Sirloin	5	400 cm ²
Pig Environment Slaughterhouse	Scalding water	5	50 mL
	Surface area -	10	400 cm ²
	pig's Feces	50	Unit
Bovine Environment Slaughterhouse	Residual water	5	50 mL
	Surface area – mat	10	400 cm ²
	Bovine's Feces	50	Unit
Human sample	Hot / dirty area	5	Unit
	Cold / clean area	5	Unit

2.2 *E. coli* isolation and characterization

Escherichia coli isolation was based on ISO17603 and ISO13136 methodology for STEC pathotype and the other Diarrheagenic *Escherichia coli* - DEC was used the traditional microbiology, respectively. For the human and animal feces, the swabs were tested by DEC isolates, firstly streaked on the MacConkey agar, incubated overnight at 37°C for 24 h. The same swab following the ISO protocol, being each swab cultivated on the Buffered Peptone Water 1% (BPW 1%, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), homogenized, and incubated overnight at 37°C for 24 hours. The product was

screened STEC by molecular test, and the samples positive for *stx* gene were streaked on MacConkey Sorbitol Agar (SMAC) as proposed by March & Ratnam (1986). For liquid and solid sample, a pre enrichment step was done. For a liquid material of 25 mL were mixed to 225 mL of BPW 1%. Solid samples, carcass and meat cuts, were collected using vegetal sponge moistened with 10 mL of saline solution 0,1%, sampling a total of 400 cm² by swab technique. The sponges were stocked in a sterile bag and added 90 mL of BPW 1%, homogenized. All pre-enrichment and agar plates were incubated overnight at 37°C for 24 h. After incubation, the pre-enrichment products were streaked into MacConkey agar (Oxoid) to DEC isolation, and other part of product was screened to *stx* gene as ISO recommendation. Samples positive for the STEC gene was then streaked to SMAC incubated at 37°C for 24 h.

E. coli suspect colonies from agar plates were selected, 4 lactose fermenting and 1 lactose non-fermenting of each sample from MAC, and 5 sorbitol fermenting and 5 sorbitol non-fermenting from SMAC, and subsequently characterized by biochemical tests using EPM agar (*Escola Paulista de Medicina*), MILi (motility, indole and lysine decarboxylase) and Simon's Citrate Agar (TOLEDO et al., 1982a; TOLEDO et al., 1982b) incubated overnight at 37°C. The cultures that presented *E. coli* characteristics were stocked for molecular tests.

2.3 Detection of *E. coli* pathotypes by multiplex PCR

The isolates identified as *E. coli* were investigated for the presence of virulence genes associated with the pathotypes using multiplex PCR for EIEC, STEC, EAEC and EPEC, and a simple reaction to ETEC. The DNA extraction was conducted by boiler technique (de Médici et al., 2003). The amplification step was conducted according Toma et al., 2013 and Aranda et al., 2007 in which primers and melting temperature are presented in Appendix A. Briefly, PCR reaction were composed by GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 2 µM of each primer (Table 4), 5 µL of DNA, and nuclease-free water (Promega) to complete a final volume of 50 µL. PCR products were electrophoresed in agarose 1,5% (w/v; Promega), stained with Unisafe (UniScience, Osasco, Brazil), and visualized using L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brazil). For all tests, the strains E2348/69, 042, H10407, EDL1284, and

O157:H7 EDL933 were used as positive control for EPEC, EAEC, ETEC, EIEC and STEC pathotypes respectively.

2.4 Phylogroup determination – Clermont Classification

E. coli identified as DEC was tested for phylogenetic groups A, B1, B2, C, D, E, F characterization as described by Clermont et al. (2013). In sum, a quadruplex-PCR with a final volume of 20 µl was prepared with GoTaq Green Master Mix (Promega), 2 µl of bacterial DNA, and 0.8 mM of each primer. For the targets E and C, the primers concentration were 0.6 mM and 1 mM, respectively. The PCR amplification program was: 94° C for 4 min, 30 cycles including 94°C for 5 s and 57°C (group E) or 59°C (quadruplex and group C) for 20s, and ending at 72°C for 5 min (Appendix A).

2.5 Identification of hlyA, stx1/stx2 and characterization of Shiga Toxins subtyping

All isolates identified as STEC, including the EHEC group were tested to enterohemolysin – *hlyA* gene (Xia et al., 2010), and Shiga toxin typing 1 and 2 (Bai, Shi, & Nagaraja, 2010). The pathogen positive for any type of Shiga toxin gene was tested to Subtypes *stx1a*, *stx1c* and *stx1d*, when positive for *stx1* in the preliminary tests and *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* and *stx2g* when the isolate was positive for *stx2* gene. The DNA extraction, amplification and electrophoresis were conducted as described previously in item 2.4. The primers used and melting temperature are described in Appendix A.

2.6 O157 and the big six identification by molecular method

E. coli Shiga toxin-producing and *E. coli* enteropathogenic were subjected to the serogroup O157, O104 and the “big six”, based on the multiplex PCR according Toro et al. (2013) and Bugarel et al. (2010). The extraction, amplification and electrophoresis were conducted as item 2.4, the primers and melting temperature as described in Appendix A.

2.7 PFGE

The strains classified as Diarrheagenic *E. coli* were subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), as described by Ribot et al. (2006). Isolates were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI; Oxoid) at 37 °C overnight, diluted to 0.8–1.2 absorbance at 610 nm, and transferred to low-melting agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The plugs were treated with proteinase K (20 mg/mL; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for DNA extraction and subjected to macro-restriction with *Xba*I (50 U; Promega). Then, each product was subjected to PFGE using CHEF-DR III (Bio-Rad): initial switch time of 2.2 s, final switch time of 63.8 s, and running time of 18 h. *Salmonella braenderup* (ATCC BAA-664) was subjected to the described procedures and considered as the reference standard pattern. PFGE profiles were analyzed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), with a Dice coefficient of 1.5% tolerance, 5% optimization, and 94.5% similarity cutoff (BioNumerics 6.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

2.8 Statistical analysis

Frequencies of *stx1/stx2* genes and phylogroup among the DEC isolates were compared by Chi-square or Fisher's exact test (0 = negative and 1 = positive) using R software, and $p < 0.05$ as the level of significance (RStudio, 2012).

3. Results

Majority of the isolates were from animal feces, 81,8% from swine and 93,5% from bovine, followed by swine pre-evisceration (7,5%) and after bleeding step in beef carcass (2,5%). From a total of 697 *E. coli* obtained, 253 was from pork production chain, 416 from beef production chain and 28 from human worker feces.

From all isolates characterized as *E. coli*, 33 were classified as DEC group, 94% (n= 31) from feces and 6% (n=2) from post-bleeding stage. The pathotypes identified were: STEC/ EHEC with 64% (n= 21) of the strains identified, 30% (n= 10) as aEPEC and 6% (n= 2) as ETEC. A total of 21 isolates of Shiga-toxin producing were analyzed and classified as: 52,4% *stx1* (n= 9), 66,6% *stx2* (n= 11) and 14,3% for the both genes *stx1* and *stx2* simultaneously (n= 3). Therefore, gene *stx2* was more prevalent than

stx1 (66,6% vs. 52,4%) there was no statistical difference between the results (P value < 0.05). Regarding *stx1* subtyping, 91% (n=7) were classified as *stx1a* and 9% (n=1) as *stx1c*. For *stx2* subtypes was as follows: 21,4% (n=3) for *stx2b*, 57,1% (n=8) for *stx2c*, 57,1% (n=8) for *stx2d*, 7,1% (n=1) for *stx2f* and 14,3% (n=2) for *stx2g*. In addition, some isolates presented more than one subtyping of *stx2*.

The Phylogroup identification using the scheme of Clermont et al. (2013) showed B1 as the most prevalent with 78,8% (n=26), followed by A, B2, C and E groups with prevalence of 9% (n=3), 6% (n=2), 3% (n=1) and 3% (n=1) respectively (Table 2). Regarding the serogroup identification, only three isolates EPEC (9,1%) were identified as group O26 (Table 2).

Table 2: Distribution of *stx* subtypes, virulence genes, pathotype, serogroup and phylogroup in 33 strains from swine and cattle.

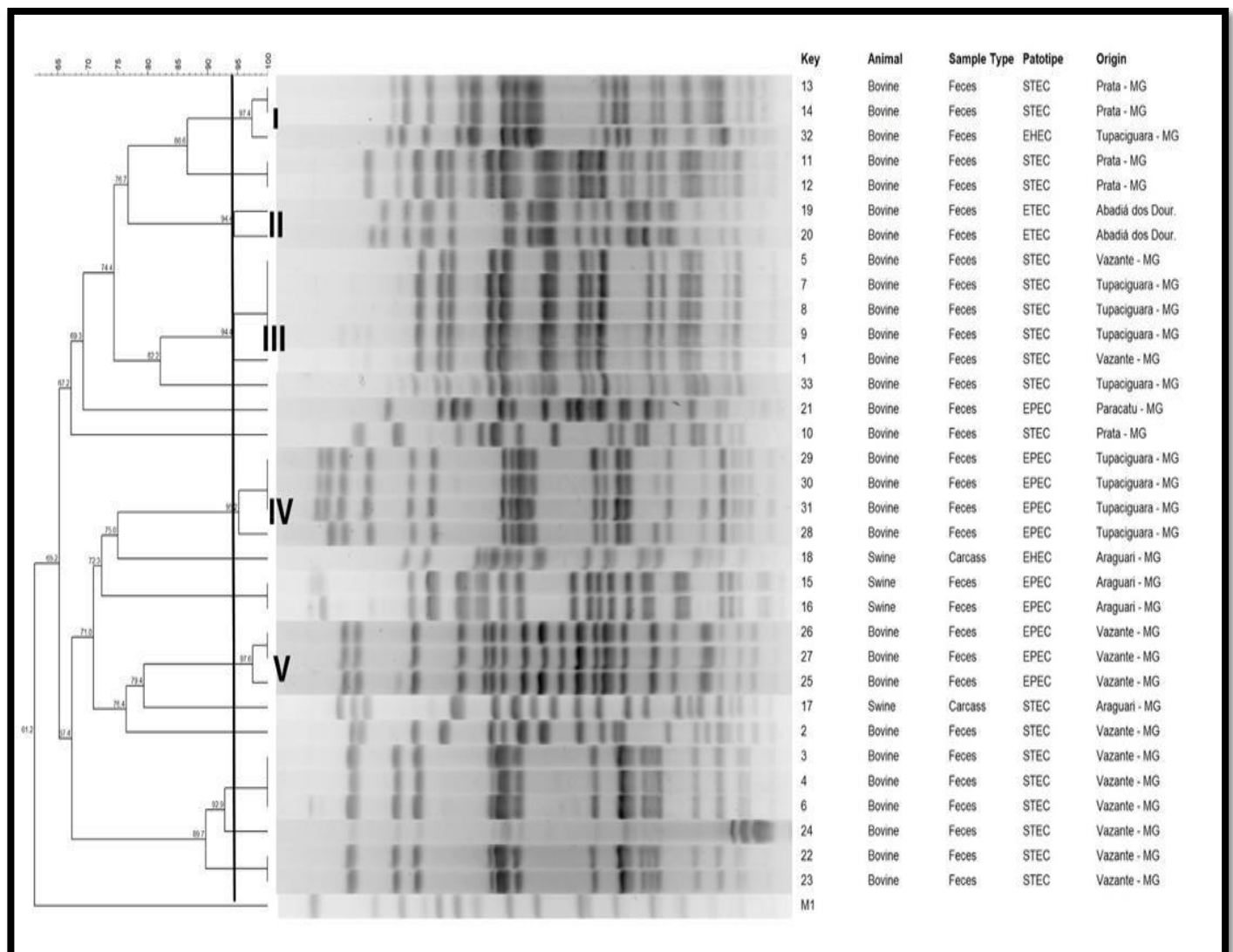
Isolate	Animal	<i>Stx</i>		<i>Stx</i> subtype							Virulence genes			Pathotype	Sero-group	Phylo-group
		<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>Stx1a</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx2b</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2d</i>	<i>Stx2f</i>	<i>Stx2g</i>	<i>eae</i>	<i>Est</i>	<i>hlyA</i>			
1	Bovine		+			+				+				STEC	NT ^a	B1
2	Bovine	+	+	+			+	+	+					STEC	NT	B1
3	Bovine		+				+	+						STEC	NT	B1
4	Bovine		+				+	+						STEC	NT	B1
5	Bovine													STEC	NT	B1
6	Bovine		+				+	+						STEC	NT	B1
7	Bovine													STEC	NT	B1
8	Bovine	+	+	+			+	+		+				STEC	NT	B1
9	Bovine	+		+										STEC	NT	B1
10	Bovine	+	+		+									STEC	NT	A
11	Bovine													STEC	NT	B1
12	Bovine	+	+			+								STEC	NT	B1
13	Bovine	+		+										STEC	NT	B1
14	Bovine	+		+										STEC	NT	B1
15	Bovine										+			EPEC	NT	B2
16	Bovine										+			EPEC	NT	B2
17 ^b	Swine	+												STEC	NT	E
18 ^b	Swine	+									+			EHEC	NT	A
19	Bovine											+		ETEC	NT	A
20	Bovine											+		ETEC	NT	C
21	Bovine										+			EPEC	NT	B1
22	Bovine	+	+			+	+	+						STEC	NT	B1
23	Bovine		+				+	+						STEC	NT	B1
24	Bovine		+				+	+						STEC	NT	B1
25	Bovine										+			EPEC	NT	B1
26	Bovine										+			EPEC	NT	B1
27	Bovine										+			EPEC	NT	B1
28	Bovine										+			EPEC	O26	B1
29	Bovine										+			EPEC	NT	B1
30	Bovine										+			EPEC	O26	B1
31	Bovine										+			EPEC	O26	B1
32	Bovine										+		+	EHEC	NT	B1
33	Bovine	+		+										STEC	NT	B1

^a: Non-typed O-serogroups.

^b: Strains belonging to the group *stx1*, but not ranked among the subtypes analyzed

The PFGE was conducted to investigate genetic relatedness among the 33 isolates, yielding 5 clusters and 11 pulsotypes with 94,4% similarity, suggesting a high diversity between the pathotypes. Isolates which shared identical PFGE profiles (100% similarity) either belonged to the same serotype or were recovered from the same origin. The genetic profiles of *E. coli* isolates obtained by PFGE are presented in Figure 1.

Figure 1: PFGE dendograms of 33 isolates from swine and cattle.



4. Discussion

This study found 4,7% (n=33) of DEC in all isolates of *E. coli* characterized. Although this microorganism remains the gastrointestinal tract of both cattle and pigs, maintaining these species as reservoirs for these bacteria (Persad and LeJeune,

2014), a small number is classified as DEC and can cause annually many foodborne diseases around the world (WHO, 2017).

The pathotype found with a high frequency in this study was the *E. coli* Shiga toxin-producing – STEC being the main source from cattle's feces. Such situation seems to be common, considering that bovine species is the major reservoir of this pathogen (Jaros et al., 2016). Several studies demonstrated this correlation in different continents, as in Europe, Asia, and South America (Gonzalez et al., 2020; Singh et al., 2019; Nüesch-Inderbilen et al., 2018; Pereira et al., 2018; Brusa et al., 2017; Jajarmi et al., 2017; Abuelhassan et al., 2016). Other specie as swine can also carry STEC strains but with low frequency, like studies described by Kučerová et al. (2018), Corello et al. (2016), Rivera et al. (2012) which showed the presence of this microorganism in this animal and corroborate the low frequency found in this project.

Results obtained in this study, demonstrate a larger presence of *stx2* type when compared to *stx1*. According to Karmali et al. (2010), Tzipori et al. (2004) and Gonzalez & Cerqueira (2020), the presence of *stx2* is correlated to a high virulence potential to cause disease in humans, especially the *stx2a*, *stx2c* and *stx2d* variants when compared to *stx1* or *stx1* and *stx2* together (Scheutz et al., 2014; Rivas et al., 2016). Other variants as *stx2e*, *stx2f* and *stx2g* are rarely described in human diseases, although are frequently reported in animals, indicating a possible future correlation of the disease in humans by these subtypes (Persad and LeJeune, 2014).

All *stx* positive isolates from pigs were classified *stx1*, fact that was uncommon when compared with other studies on the literature, where the related subtyping was the *stx2e* (Tseng et al., 2014). The hypothesis to the presence of this atypical subtyping may be due to the adaptation of this subtype to the swine host, as noted in the survey of data from Frataminco et al., 2004. Although, this evidence does not rule out the possibility that the swine can be a reservoir of STEC, as observed in other researches (Cha et al., 2018; Tseng et al., 2014; Nakazawa et al., 1999).

Two isolates of EHEC non-O157 were identified in this study, one from cattle, isolated from feces and one from swine in the post-bleeding stage, both belonging to the *stx1*. In addition, the bovine strain was positive for the enterohemolysin gene (*hlyA*) and intimin gene (*eae*), subtyped as *stx1a* and belonging to group E. Characteristics related to the invasive power of EHEC group (Bielaszewska et al., 2014; Castro et al.,

2017; Clermont et al., 2013; Tenaillon et al., 2010; Paton et al., 1998). In addition, some other virulence genes that were not addressed in this study may be associated with these strains, since all EHEC are considered pathogenic (Nataro & Kaper, 1998).

All EPEC isolates of this study were identified as aEPEC, a common pathogen predominant in animals that doesn't carry *bfp* gene (Tozzoli et al., 2014; Xu et al., 2017). Three isolates from bovine feces were identified belonging to serogroup O26, a subtype widely reported in cattle (Aidar-Ugrinovish et al, 2007; Monaghan et al, 2012; Hernandez et al., 2009), water sources (Xu et al., 2017), and recognized as a potential human pathogen (Sekse et al., 2011) reported by WHO as important and classic serogroup (WHO, 1987) responsible for being one of the main agents causing diarrhea in children under 2 years old (Ochoa et al., 2008; Lanata et al., 2013). Other significant information is that aEPEC O26 could be a precursor for STEC that has lost the *stx* gene (Bielaszewska et al., 2014; Sekse et al., 2011) and considering the fact that bovine is a reservoir of STEC, the data obtained in this work confirms this statement.

An important found was to isolate ETEC from cattle feces. This pathotype is responsible for diarrhea in humans, and also recognized for being one of the most frequent causes of childhood diarrhea in developing countries (Nagy & Fekete, 2005). Thermostable toxin (ST), found in the isolates of the present study, normally is responsible to cause watery diarrhea and dehydration (Isidean et al., 2011).

Phylogroup B1 was the most frequent in this study, this occurs, because this group is quite associated with herbivorous mammal animals (Carlos et al., 2010), despite being considered a generalist group that presents isolates in birds, monogastric, polygastric, mammals and herbivores, indicating high dispersion and ability to survive in the environment (Coura et al., 2015; Gordon et al., 2003; Baldy-Chudzik et al 2008). There is an evolutionary association of common ancestors between groups A and B1, evidenced by having a smaller genome and having less virulence factors, when compared to groups B2 and D (Carlos et al., 2010). Associations involving the phylogroups indicates that normally ExPEC strains belongs to groups B2, E, F and D, commensal strains to groups A and B1, while DEC strains belong to groups A, B1, D and E (Köhler et al., 2011; Sarowska, et al., 2019; Baldy-Chudzik et al., 2008).

The PFGE showed the presence of five main clusters and 11 distinct pulsotypes. It's noteworthy that most of clusters grouped isolates with the same pathotype and the same phylogenetic group. This situation was also reported by Vaz et al. (2006) and corroborates the results. According to the data obtained with the aid of this technique, it was not possible to confirm the cross contamination between the species slaughtered in the same processing line. However, the presence of one pulsotype in the cluster I and III from different farms and cities raise the hypothesis of circulation of same clone on these locals.

5. Conclusion

This study provided important information regarding pathogenic *E. coli* isolated from mixed slaughterhouse, demonstrating that there was no cross-contamination between different species slaughtered in the same place, demonstrating that pathogen control programs are being effective in this analyzed slaughterhouse. Our results indicated that STEC were the most frequent pathovar identified in the samples, followed by EPEC, ETEC and EHEC. Majority of isolates were classified in B1 phylogroup which are associated with environmental contamination, and the detection of other pathovars was very low. The PFGE tools, a correlation was established between phylogroups and pathotypes. Nevertheless, further studies should be performed to assess the cross-contamination in mixed slaughterhouses to evaluate the possibility of exchange of genetic elements for those pathogens.

6. Bioethics and Biosecurity Committee Approval

All animal procedures were approved by the *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CEUA/UFV), protocol 49/2019. And all human procedures were approved by *Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos* (CEP), protocol 3.366.308.

7. Acknowledgements

The authors are thankful to CAPES (Financial Code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG and CNPq.

REFERENCES

- Abuelhassan, N. N., Mutalib, S. A., Gimba, F. I., & Yusoff, W. M. (2016). Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from imported beef meat in Malaysia. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(17), 17553–17562. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6954-0>
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D. L., Silveira, W. D., & Pestana de Castro, A. F. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.046>
- Aslam, M., Greer, G. G., Nattress, F. M., Gill, C. O., & McMullen, L. M. (2004). Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef-packing plant. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 78–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02277.x>
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., Erol, I., 2014. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7+/H7– isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *International Journal of Food Microbiology* 174, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.002>
- Bai, J., Shi, X., & Nagaraja, T. G. (2010). A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.003>
- Baldy-Chudzik, K., Mackiewicz, P., & Stosik, M. (2008). Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology*, 131(1-2), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.019>
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., & Karch, H. (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(5-6), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.05.005>
- Brusa, V., Restovich, V., Galli, L., Teitelbaum, D., Signorini, M., Brasesco, H., Londero, A., García, D., Padola, N. L., Superno, V., Sanz, M., Petroli, S., Costa, M., Bruzzone, M., Sucari, A., Ferreghini, M., Linares, L., Suberbie, G., Rodríguez, R., & Leotta, G. A. (2017). Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia*

coli from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PloS one*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183248>

Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I., Gomes, T. A., Amaral, L. A., & Ottoboni, L. M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10, 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-161>

Castro, V. S., Carvalho, R., Conte-Junior, C. A., & Figueiredo, E. (2017). Shiga-toxin Producing *Escherichia coli*: Pathogenicity, Supershedding, Diagnostic Methods, Occurrence, and Foodborne Outbreaks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1269–1280. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12302>

Cha, W., Fratomico, P. M., Ruth, L. E., Bowman, A. S., Nolting, J. M., Manning, S. D., & Funk, J. A. (2018). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *International Journal of Food Microbiology*, 264, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.017>

Clermont, O., Gordon, D., & Denamur, E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*, 161(5), 980–988. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000063>

Colello, R., Cáceres, M. E., Ruiz, M. J., Sanz, M., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2016). From Farm to Table: Follow-Up of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Throughout the Pork Production Chain in Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 7, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00093>

Coura, F. M., Diniz, S., Silva, M. X., Mussi, J. M., Barbosa, S. M., Lage, A. P., & Heinemann, M. B. (2015). Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *The Scientific World Journal*, 2015, 258424. <https://doi.org/10.1155/2015/258424>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L. (2003). Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3456-3461. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3456-3461.2003>

Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O' Brien, S., & Butler, F. (2006). A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science*, 74(1), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.011>

Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Bush, E. J., & Solow, B. T. (2004). Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7173–7178. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7173-7178.2004>

Gonzalez, A.G.M, & Cerqueira, A.M.F (2020). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1568–1582. <https://doi.org/10.1111/jam.14500>

Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149(12), 3575–3586. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>

Hernandes, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., & Gomes, T. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), 137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x>

Isidean, S. D., Riddle, M. S., Savarino, S. J., & Porter, C. K. (2011). A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*, 29(37), 6167–6178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.084>

Jajarmi, M., Imani Fooladi, A. A., Badouei, M. A., & Ahmadi, A. (2017). Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 109, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.04>

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Jaros, P., Cookson, A. L., Reynolds, A., Prattley, D. J., Campbell, D. M., Hathaway, S., & French, N. P. (2016). Nationwide prevalence and risk factors for faecal carriage

of *Escherichia coli* O157 and O26 in very young calves and adult cattle at slaughter in New Zealand. *Epidemiology and Infection*, 144(8), 1736–1747. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003209>.

Joris, M. A., Pierard, D., & De Zutter, L. (2011). Occurrence and virulence patterns of *E. coli* O26, O103, O111 and O145 in slaughter cattle. *Veterinary Microbiology*, 151(3-4), 418–421. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.003>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Köhler, C. D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 301(8), 642–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>

Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>

Kučerová, D., Koláčková, I., & Karpíšková, R. (2018). *Klinická mikrobiologie a Infekční Lekarství*, 24(2), 36–40.

Kumar, A., Taneja, N., & Sharma, M. (2014). An epidemiological and environmental study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in India. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 439–446. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1613>

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., & Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS One*, 8(9), e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>

March, S. B., & Ratnam, S. (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 869–872. <https://doi.org/10.1128/JCM.23.5.869-872.1986>

Monaghan, Á., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., & Bolton, D. J. (2013). Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*

(EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 595–603. <https://doi.org/10.1111/jam.12064>

Nagy, B., & Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 295(6-7), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201.

Nakazawa, M., & Akiba, M. (1999). Swine as a potential reservoir of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 833–834. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990618>

Nüesch-Inderbinnen, M., Morach, M., Cernela, N., Althaus, D., Jost, M., Mäusezahl, M., Bloomberg, G., & Stephan, R. (2018). Serotypes and virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2017 from human infections in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 308(7), 933–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.06.011>

Ochoa, T. J., Barletta, F., Contreras, C., & Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(9), 852–856. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.017>

Paton, A. W., & Paton, J. C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 598–602. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>

Pereira, J. G., Soares, V. M., Tadielo, L. E., Dos Santos, E., Lopes, G. V., da Cruz Payão Pellegrini, D., Duval, E. H., & da Silva, W. P. (2018). Foods introduced into Brazil through the border with Argentina and Uruguay: Pathogen detection and evaluation of hygienic-sanitary quality. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.013>

Persad, A. K., & LeJeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014>

Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>

Rivas M., Chinen I., Guth B.E.C. (2016). Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. In: Torres A. (eds) *Escherichia coli* in the Americas. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45092-6_5

Rivera, F. P., Sotelo, E., Morales, I., Menacho, F., Medina, A. M., Evaristo, R., Valencia, R., Carbajal, L., Ruiz, J., & Ochoa, T. J. (2012). Short communication: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1166–1169. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4662>

RStudio. (2012). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio Inc, Boston, Massachusetts 74. URL: <http://www.rstudio.com/>

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing *Stx* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2951–2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>

Sekse, C., Sunde, M., Lindstedt, B. A., Hopp, P., Bruheim, T., Cudjoe, K. S., Kvitle, B., & Urdahl, A. M. (2011). Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4949–4958. <https://doi.org/10.1128/AEM.00189-11>

Singh, P., Metgud, S. C., Roy, S., & Purwar, S. (2019). Evolution of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in India. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(4), 346–351. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_58_19

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>

Toledo, M.R.F.; Pontes, C.F.; Trabulsi, L.R. (1982a). MILi - a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase. *Revista de Microbiologia*. 13 (3), 230-235, 1982

Toledo, M.R.F.; Pontes, C.F.; Trabulsi, L.R., (1982b). EPM - a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase. *Revista de Microbiologia* 13(4), 309-15.

Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., & Iwanaga, M. (2003). Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2669–2671. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2669-2671.2003>

Toro, M., Najjar, M. B., Ju, W., Brown, E., Zhao, S., & Meng, J. (2013). Molecular serogrouping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using suspension array. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(5), 478–480. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1352>

Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Fioravanti, R., Gally, D., Xu, X., La Ragione, R., Anjum, M., Wu, G., Caprioli, A., & Morabito, S. (2014). Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. *Infection and Immunity*, 82(7), 3023–3032. <https://doi.org/10.1128/IAI.01836-14>

Trabulsi, R.T; Alerthum, F.; Candeias, J.N.; Gompertz, O.F. (2004). *Microbiologia*. 4^aed. São Paulo: Atheneu. 28, 215-228.

Tseng, M., Fratamico, P. M., Manning, S. D., & Funk, J. A. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal Health Research Reviews*, 15(1), 63–75. <https://doi.org/10.1017/S1466252313000170>

Vaz, T. M., Irino, K., Nishimura, L. S., Cergole-Novella, M. C., & Guth, B. E. (2006). Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 798–804. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.798-804.2006>

Warriner, K., Aldsworth, T. G., Kaur, S., & Dodd, C. E. (2002). Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1), 169–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01678.x>

WHO- World Health Organization (1987) *Programme for Control of Diarrhoeal Diseases*. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. World Health Organization, Geneva.

WHO - World Health Organization (2017). *Diarrhoeal Disease*. Available online at: [https:// www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease) (accessed January 21, 2021).

Xia, X., Meng, J., McDermott, P. F., Ayers, S., Blickenstaff, K., Tran, T. T., Abbott, J., Zheng, J., & Zhao, S. (2010). Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1709–1717. <https://doi.org/10.1128/AEM.01968-09>

Xu, Y., Bai, X., Jin, Y., Hu, B., Wang, H., Sun, H., Fan, R., Fu, S., & Xiong, Y. (2017). High Prevalence of Virulence Genes in Specific Genotypes of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 109. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00109>

Yang, X., He, A., Badoni, M., Tran, F., Wang, H. (2017). Mapping sources of contamination of *Escherichia coli* on beef in the fabrication facility of a commercial beef packing plant. *Food Control*, 75, 153-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.004>

APPENDIX

Appendix A. Sequence of primers used in this study

Gene	Sequence (5'-3')	Target (pb)	TM (°C)	Reference
eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	eae (917)	50	Aranda et al. (2007)
eae2	CTGAACGGCGATTACGCGAA			
BFP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	bfpA (326)	52	
BFP2	CCGCTTTATCCAACCTGGTA			
aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	aggR (254)	52	
aggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
ipaH1	GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	ipaH (600)	52	
IpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
vtcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	stx (518)	52	
vtcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			
elt- F	GGCCGCAGATTATACCGTGC	LT (450)	48	Toma et al. (2013)
elt -R	CGGTCTCTATATTCGGTGC			
est-F	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	ST (190)	48	
est- R	CACCCGGTACARGCAGATT			
hlyA F	AGCCGGAACAGTTCTCTCAG	hlyA (527)	60	Xia et al. (2010)
hlyA R	CCAGCATAACAGCCGATGT			
stx1 F	TGTCGCATAGTGGAACCTCA	stx1 (655)	65	Nagaraja et al. (2010)
stx1 R	TGCGCACTGAGAAGAAGAGA			
stx2 F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	stx 2 (477)	65	
stx2 R	TGTCGCCAGTTATCTGACATTC			
stx1a F	CCTTTCCAGGTACAACAGCGTT	stx1a (478)	56	Scheutz et al. (2012).
stx1a R	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG			
stx1c F	CCTTTCCTGGTACAACCTGCGTT	stx1c (252)	56	
stx1c R	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA			
stx1d F	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	stx1d (203)	56	
stx1dR	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA			
stx2a F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	stx2a	64-66	
stx2a R3	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	(349)	64-67	
stx2a R2	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	(347)	64-68	
stx2b F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	stx2b (251)	56	
stx2b R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
stx2c F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	stx2c (177)	64-66	
stx2c R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA			
stx2d F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	stx2d	64-66	
stx2d R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	(179)	64-67	
stx2d 055-R	TCAACCGAGCACTTGCAGTAG	(235)	64-68	
stx2d R2	GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC	(280)	64-69	
stx2e F	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	stx2e (411)	56	
stx2e R	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT			
stx2f F	TGGGCGTCATTCAGTGGTTG	stx2f (424)	56	
stx2f R	TAATGGCCGCCCTGTCTCC			
stx2g F	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	stx2g (573)	56	
stx2gR	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT			
O26 F	GTGTGTCTGGTTCGTATTTTTATCTG	O26 (438)	56	Toro et al. (2013)
O26 R	CCTTATATCCCAATATAGTACCCACCC			
O45 F	GGTCGATAACTGGTATGCAATATG	O45 (341)	56	
O45 R	CTAGGCAGAAAGCTATCAACCAC			

O103 F	TTATACAAATGGCGTGGATTGGAG			
O103 R	TGCAGACACATGAAAAGTTGATGC	O103 (385)	56	
O111 F	TTCGATGTTGCGAGGAATAATTC			
O111 R	GTGAGAGCCCACCAGTTAATTGAAG	O111 (361)	56	
O121 F	AGTGGGGAAGGGCGTTACTTATC			
O121 R	CAATGAGTGCAGGCAAAATGGAG	O121 (366)	56	
O145 F	CCTGTCTGTTGCTTCAGCCCTTT			
O145 R	CTGTGCGCGAACCCTGCTAAT	O145 (392)	56	
O157 F	TCGTTCTGAATTGGTGTGCTCA			
O157 R	CTGGTGTGCGAAAGAAATCGTTC	O157 (278)	56	
O104 F	TGTCGCGCAAAGAATTTCAAC			
O104 R	AAAATCCTTTAAACTATACGCC	O104 (100)	64	Bugarel et al. (2010)
chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	chuA (288)	55	
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	yjaA (211)	55	
yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	TspE4.C2	55	
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	(152)		
AceK.f	TCTCCCCATACCGTACGCTA			Clermont et al. (2013)
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	arpA (400)	55	
ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	arpA group		
ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	E (301)	57	
trpAgpC.1	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	trpA group C		
trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC	(219)	59	