

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carcaças e cortes de frango: ocorrência,
características de virulência e diversidade genética

Andressa Mem

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carcaças e cortes de frango: ocorrência,
características de virulência e diversidade genética

Andressa Mem

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018/2011

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2020

Andressa Mem

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carcaças e cortes de frango: ocorrência,
características de virulência e diversidade genética

Comissão julgadora da
dissertação para obtenção do título de Mestre

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Mem, Andressa
M553e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carcaças e cortes de frango: ocorrência, características de virulência e diversidade genética
/ Andressa Mem. – São Paulo, 2020.
61 p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Orientador: Landgraf, Mariza

1. Carne de frango. 2. *Escherichia coli*. I. T. II. Landgraf, Mariza, orientadora.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Devair e Fátima, pelo constante suporte e por serem exemplos de superação e vida, meu eterno agradecimento por me proporcionarem tudo que foi necessário para chegar onde cheguei. À minha irmã e cunhado, Charlene e Jehonathan, pelo imenso apoio.

Ao meu noivo, Rodrigo, por ser meu porto-seguro em momentos de fraqueza, pelo amor e apoio incondicional e principalmente por acreditar em mim quando eu não acreditava em mim mesma. Você é incrível!

À minha orientadora Profa. Dra. Mariza Landgraf, pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Bernadette Franco e Uelinton Pinto pela ajuda nesta jornada.

Aos amigos Kátia, Daniel, Igor, Luiz, Marcela e Thainá, por toda ajuda, paciência, risadas e principalmente pela amizade que levarei para vida.

Aos meus sogros Edison e Cecília, por todo apoio desde a minha vinda a São Paulo.

Aos amigos do laboratório Lúcia, Ana Paulina, Ana Clara, Carolina, Carlos, Augusto, Catarina, Daniele, Diogo, Emilia, Jéssica, Loredana, Raquel e Ximena.

Às amigas Mariana, Angélica, Ana e Carol por tornar a nossa casa um lar divertido.

À Profa. Dra. Beatriz Guth, por ceder o laboratório para algumas análises e pelos ensinamentos e sugestões.

Aos professores Roxane Piazza e Gustavo Lacorte pelas sugestões e críticas no exame de qualificação.

Ao Luis Fernando dos Santos, do Instituto Adolfo Lutz, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e à JBS SA pelo financiamento da pesquisa.

Aos funcionários da FCF por toda ajuda e paciência.

A todos que de alguma maneira colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Mem, A. ***Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carcaças e carne de frango: ocorrência, características de virulência e diversidade genética.**

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

De maneira global, há poucas informações sobre a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em carcaças de aves e cortes de frango, inclusive no Brasil, o maior exportador mundial de carne de frango. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a presença de *E. coli* produtora de toxina de Shiga em amostras de carcaça e de cortes de frango provenientes das regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, estudar seus fatores de virulência e diversidade genética. Os métodos empregados para detecção de STEC foram USDA MLG 5B.05 e ISO/TS13136 (2012), com modificações, e para a diversidade genética, foram utilizadas as técnicas de amplificação das sequências intergênicas consensus repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) e a análise de Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE). Das 200 amostras analisadas, 13 (6,5%) foram positivas para os genes *stx*; 4 apresentaram o gene *stx*₁ e 11 o gene *stx*₂. As amostras positivas para STEC foram 3 (23%) carcaças inteiras, 1 (7,6%) corte de asa, 2 (15,4%) cortes de coxa, 4 (30,7%) cortes de peito e 3 (23%) amostras de carne mecanicamente separada (CMS). Essas amostras vieram do Paraná (5 amostras, 38,4%), de Santa Catarina (2; 15,4%), de São Paulo (3; 23%) e de Mato Grosso do Sul (3;23%). Com relação à subtipagem de *Stx*, todos os isolados portadores do gene *stx*₁ foram identificados como *stx*_{1a}, enquanto os portadores do gene *stx*₂ se dividiram entre *stx*_{2e} e *stx*_{2f}. Nenhum dos isolados apresentou reação positiva para o sorogrupo O157 ou para os sorogrupos O26, O103, O111, O121 e O145. Duas amostras (peito e coxa), que apresentaram o gene *stx*₁, pertencem ao mesmo sorotipo O45:HNM. Os isolados que apresentaram maior similaridade genotípica mostraram o mesmo perfil de virulência (*stx*_{1a} e *stx*_{2f} respectivamente) e pertencem ao mesmo sorotipo (O45:NM e O114:H4 respectivamente). Além disso, suas amostras foram coletadas no mesmo estado. Adicionalmente à presença apenas do gene *eae*, que indica a presença de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), o gene *bfp* foi observado em três (6,1%) (carcaça, peito e asa) dessas 49 amostras (119 isolados) caracterizando como EPEC típica. Uma vez que o Brasil se mantém em destaque no mercado internacional como o principal exportador de carne de frango, além dela ser amplamente consumida no país, a detecção de STEC e EPEC nessas amostras reforça a necessidade das boas práticas de produção e manipulação (GMP). Portanto, o monitoramento contínuo na cadeia produtiva a fim de detectar o surgimento de novas cepas ou clones é de importância crítica em termos de saúde pública, assim como medidas de alerta acerca de novos riscos à segurança dessa carne, um dos alimentos mais comercializados e consumidos mundialmente.

Palavras-chave: STEC, frango, carcaça, cortes de frango, O157, não-O157

ABSTRACT

Mem, A. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chicken carcass and chicken cuts: occurrence, virulence characteristics and genetic diversity.**

Globally, there is few information regarding the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in chicken carcasses and cuts, including in Brazil, the world's largest poultry meat exporter. This study aimed to evaluate the presence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in chicken carcasses and cut samples from Midwest, Southwest and South regions of Brazil, determining its virulence factors and genetic diversity. The methods used for STEC detection were USDA MLG 5B.05 and ISO/TS13136 (2012), with modifications, and for genetic diversity analysis, the techniques used were Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) and Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE). From 200 samples analyzed, 13 (6,5%) presented *stx* genes; 4 were positive for *stx*₁ gene and 11 for *stx*₂ gene. The STEC positive samples were: 3 (23%) whole carcasses, 1 (7.6%) wing cuts, 2 (15.4%) thigh cuts, 4 (30.7%) breast cuts and 3 (23%) samples of mechanically deboned meat (MDM). Regarding the state origin, 5 (38.4%) came from Paraná, 2 (15.4%) from Santa Catarina, 3 (23%) from São Paulo and 3 (23%) from Mato Grosso do Sul. Concerning Stx subtyping, all isolates showing *stx*₁ gene were positive for *stx*_{1a}, while *stx*₂ gene positive isolates presented *stx*_{2e} and *stx*_{2f}. None of the isolates were positive for O157 serogroup or O26, O103, O111, O121 e O145 serogroups. Two samples (breast and thigh cuts), positive for *stx*₁, belonged to serotype O45:HNM. The isolates presenting higher genotypic similarity, showed the same virulence profile (*stx*_{1a} and *stx*_{2f} respectively) and belonged to the same serotype (O45:NM and O114:H4 respectively). Moreover, samples of isolates were collected in the same State. The presence of *bfp* gene was observed in three (6.1%) (whole carcass, breast and wing cuts) out of 49 samples (119 isolates) showing only *eae* gene, indicating the presence of enteropathogenic *E. coli*. Since Brazil is on spotlight regarding international market as the largest chicken meat exporter, and chicken meat is also the most consumed meat in this country, STEC and EPEC detection reinforces the need for good production and handling practices (GMP). Therefore, continuous monitoring in order to detect the rise of new strains or clones is very important in terms of public health, as warning measures about new risks related to this meat, one of the most traded and consumed food worldwide.

Keywords: STEC, chicken carcass, chicken cuts, O157, non-O157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação dos sorogrupos de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga previamente relacionados com infecções em seres humanos.

Figura 2. Algumas ocorrências de STEC reportadas em carne bovina, suína e de frango.

Figura 3. Esquema do processo de abate de aves com indicações dos pontos de coleta.

Figura 4. Fluxo de análise aplicado nas amostras de carne de frango.

Figura 5. Número de amostras positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga por número total de amostras de frango analisada.

Figura 6. Número de amostras de carcaça e cortes de frango positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga por estado em que foram coletadas.

Figura 7. Número de amostras positivas para o gene *eae* por número total de amostras de frango analisada.

Figura 8. Número de amostras de carcaça e cortes de frango positivas para o gene *eae* por estado em que foram coletadas.

Figura 9. Dendrograma baseado no padrão de ERIC-PCR das cepas de *E. coli* produtora de toxina de Shiga isoladas de carcaças e carne de frango.

Figura 10. Dendrograma baseado no padrão de PFGE das cepas de *E. coli* produtora de toxina de Shiga isoladas de carcaças e carne de frango.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns surtos causados por *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga envolvendo diversos alimentos de origem animal no período de 2010 a 2019.

Tabela 2. Sequências iniciadoras e condições utilizadas nos ensaios de PCR

Tabela 3. Cepas e seus respectivos números de acesso usados para análise de subtipo.

Tabela 4. Sequências iniciadoras e condições utilizadas nos ensaios de PCR

Tabela 5. Perfil de virulência, sorotipo, estado de origem e data de coleta das amostras positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	Attaching and effacing
API	Analytical Profile Index
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BFP	<i>bunding-forming pili</i>
BPW	Buffered Peptone Water
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMS	Carne mecanicamente separada
CSI	Certificado Sanitário Internacional
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eae	Gene codificador para a proteína itimina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> entero-agregativa
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
Ehx	Enterohemolisina
ehxA	Gene codificador para enterohemolisina A
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
fliC	Gene da flagelina C
g	Grama
h	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
min	Minuto
mL	mililitro
MSCTK	Ágar MacConkey Sorbitol adicionado de cefixima e telurito de potássio
mTSB	Caldo Trypticase Soja modificado

nM	Nanomolar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RBA	Ágar Rainbow
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga
stx	Gene que codifica Stx
Stx	Toxina Shiga-like
TBE	Tris/Borato/EDTA
USDA:FSIS	United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service
USP	Universidade de São Paulo
V	volt
Vtx	Verotoxina
WHO	Organização Mundial da Saúde
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT... ..	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. STEC e Principais Marcadores de Virulência	14
1.2 STEC e Carnes.....	16
1.3. STEC em Frangos.....	18
1.4. Surtos.....	18
1.5. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Material.....	24
3.1.1. Amostragem.....	24
3.2. Métodos.....	24
3.2.1. Enriquecimento Primário.....	24
3.2.2. Isolamento de Colônias Suspeitas.....	26
3.2.3. Reação de PCR para pesquisa dos genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> e <i>ehx</i> de STEC.....	26
3.2.4. Análise dos genes de virulência por sequenciamento de fragmentos específicos (Sanger).....	27
3.2.5. Diversidade Genética.....	31
3.2.5.1. ERIC-PCR... ..	31
3.2.5.2. Similaridade por PFGE.....	32
3.2.6. Sorotipagem.....	32
3.2.7. Caracterização de <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Identificação de sequências para <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ e <i>eae</i>	35
4.2. Identificação de sequências para <i>stx</i> ₁ e <i>stx</i> ₂ através do sequenciamento Sanger.....	39
4.3. Sorotipagem.. ..	39
4.4. ERIC-PCR... ..	39
4.5. PFGE... ..	40
4.6. Caracterização de <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	41
5. DISCUSSÃO... ..	42
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui papel relevante no mercado internacional de produtos de origem animal, sendo o maior exportador mundial de carne bovina e de frango (ABIEC, 2019; ABPA, 2019). Desta maneira, garantir a qualidade e inocuidade desses alimentos e atender às legislações dos países importadores é um desafio.

A contaminação por bactérias da família Enterobacteriaceae é uma das grandes preocupações em relação ao consumo de carnes. A ocorrência destas bactérias surge da contaminação da carcaça através de ruptura intestinal durante o processamento na etapa de evisceração, permitindo o contato do conteúdo fecal com a carcaça e, ainda, pela contaminação cruzada, de manipuladores e equipamentos e utensílios (UYTTENDAELE et al. 1998; DOREGIRAE et al. 2016).

Dentre os patógenos veiculados por alimentos de maior preocupação, encontra-se a *Escherichia coli*, bacilo Gram-negativo, pertencente à microbiota intestinal de seres humanos e outros mamíferos, que inclui alguns patótipos que podem causar graves enfermidades, principalmente em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (CROXEN et al. 2013). O uso do esquema sorológico desenvolvido por Kauffman em 1944 foi utilizado durante muito tempo como base para classificação dos isolados de *E. coli* nos diferentes patótipos. No entanto, atualmente, essa classificação tem como base seus mecanismos de patogenicidade uma vez que o mesmo sorotipo pode pertencer a mais de um patótipo. *E. coli* patogênicas são classificadas em grupos específicos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* entero-agregativa (EAEC) e *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC). Atualmente, são conhecidos mais de 700 sorotipos de *E. coli*, baseados nos antígenos O (somático), H (flagelar) e K (capsular); no entanto, uma cepa pode não apresentar os três antígenos simultaneamente, usando-se em muitos casos, apenas os antígenos O e H para sorotipagem (MENG et al. 2013).

STECs são responsáveis por diversos distúrbios gastrointestinais em seres humanos, variando de diarreias brandas à colite hemorrágica, especialmente em crianças e idosos e em casos mais graves, podendo evoluir para a síndrome hemolítica-urêmica (SHU) ou púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). A SHU, além dos conhecidos problemas renais, também pode levar a complicações neurológicas, como convulsões, acidente vascular cerebral e coma. Em muitos casos, a lesão renal não é permanente, ocorrendo a recuperação da função deste

órgão. No entanto, para sintomas neurológicos, não há tratamento rotineiro adequado, ocorrendo frequentes sequelas neurológicas (PAPE et al. 2015).

1.1. STEC e Principais Marcadores de Virulência

Desde o primeiro relato de surto alimentar envolvendo *E. coli* O157:H7 (RILEY et al., 1983), as cepas deste sorotipo eram as mais frequentemente estudadas. No entanto, a partir dos anos 2000, verificou-se um aumento no número de surtos causados por cepas não-O157, principalmente daquelas pertencentes aos sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (USDA, 2012; VENEGAS-VARGAS et al. 2016). Como resultado do aumento da importância de STECs não-O157, o *Food Safety Inspection Service do United States Department of Agriculture* (USDA:FSIS) passou a considerar, em 2012, este grupo, atualmente conhecido como *Big Six*, uma ameaça à saúde pública, semelhante àquela representada por *E. coli* O157:H7 (ELDER et al. 2016). Vários outros sorogrupos, no entanto, já foram associados a infecções em humanos, como relatado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde (FAO WHO, 2019) discriminados na Figura 1.

STEC produz uma toxina conhecida como verotoxina (Vtx), por sua atividade em células Vero (células de rim de macaco), ou toxina de Shiga (Stx), por ser semelhante à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, causadora da disenteria bacilar (MENG et al. 2013). Ela é formada por uma subunidade A e 5 subunidades B. Seu mecanismo de ação ocorre pela sua ligação aos receptores de superfície celular Gb3 sendo internalizada por endocitose e, no interior da célula, causa inibição da síntese proteica através de uma cascata de eventos. A maior ou menor afinidade da toxina pelo receptor na superfície celular ou ainda a maior eficiência no transporte inter ou intracelular influi na capacidade de inibição da síntese proteica (GUTH, 2015; MENG et al. 2013). Esse mecanismo causa estresse na célula o que pode levar à liberação de citocinas e morte celular por apoptose (PENNINGTON, 2010). No rim, estes receptores estão presentes em células endoteliais glomerulares e em vários tipos de células epiteliais tubulares onde a toxina se liga, resultando em morte de células glomerulares e tubulares e microangiopatia (BRUYAND et al. 2018).

Stx é uma família de toxinas composta por dois grupos distintos: Stx1 e Stx2, cujos genes que as codificam são encontrados em um fago integrado ao genoma bacteriano, o que permite a disseminação entre diferentes cepas e também a coexistência dos genes *stx₁* e *stx₂* em

uma mesma bactéria (PATON & PATON, 1998). Stx2 é genética e imunologicamente distinta, com 55-60% de similaridade em suas sequências genéticas e de aminoácidos (PENNINGTON, 2010). Stx1 apresenta os subtipos Stx1a, Stx1c e Stx1d, e Stx2, fator de virulência primário para o desenvolvimento da SHU, e possui diversos subtipos: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (SCHEUTZ et al. 2012), Stx2h (BAI et al. 2018), Stx2i (LACHER et al. 2016) e, mais recentemente, Stx2k (Hughes et al. 2020). Os subtipos Stx1c e Stx1d raramente são associados à patogenicidade em seres humanos, já os subtipos Stx2a, Stx2c e Stx2d são associados a enfermidades em humanos. Por outro lado, Stx2e, Stx2f e Stx2g são majoritariamente encontrados em animais (MELTON-CELSA, 2014).

Figura 1. Relação dos sorogrupos de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga, previamente relacionados com infecções em seres humanos.

01	032	070	0107	0134	0168
02	036	071	0108	0135	0169
03	037	073	0109	0136	0169-0183
04	038	074	0110	0137	0171
05	039	075	0111	0138	0172
06	040	076	0112	0139	0173
07	041	077	0112ab	0141	0174
08	042	078	0113	0142	0175
09	043	079	0114	0143	0176
09ab	044	080	0115	0145	0177
010	045	081	0116	0146	0178
011	046	082	0117	0147	0179
012	048	083	0118	0148	0180
013	049	084	0119	0149	0181
014	050	086	0120	0150	0182
015	051	087	0121	0151	0183
016	052	088	0123	0152	0185
017	054	089	0123-0186	0153	0186
018	055	090	0124	0153-0178	0187
019	057	091	0125	0154	0188
020	058	092	0125ac	0156	0189
021	059	093	0126	0157	OgC4-0118-0151
022	060	096	0127	0158	OX3
023	061	098	0128	0159	OX7
024	062	0100	0128ab	0160	OX177
025	063	0101	0128ac	0161	OX178
026	064	0102	0129	0162	O-Dys1
027	065	0103	0130	0163	O-Rough
028	066	0104	0131	0164	O-Untypeable
029	068	0105	0132	0165	
030	069	0106	0133	0166	

Fonte: FAO/WHO (2019).

Algumas cepas unem-se firmemente às células intestinais através de uma adesina chamada intimina, provocando alterações na mucosa intestinal, aderindo e proliferando nesse local, causando lesões histopatológicas denominadas A/E (*attaching and effacing*) (MENG et al. 2013). Os genes associados a este tipo de lesão, como o *eae*, encontram-se em uma ilha de patogenicidade chamada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) (MCDANIEL et al. 1995; BOERLIN et al. 1999). Outro fator de aderência, a adesina autoaglutinante Saa (STEC *autoagglutination adhesin*), não presente na região LEE, também foi identificado (PATON et al. 2001) e pode ser encontrado em cepas LEE-negativas (WU et al. 2010).

A enterohemolisina (Ehx), proteína codificada pelo gene *ehxA* associado ao plasmídeo pO157 que contém o locus Ehx, também é considerado um fator de virulência (COOKSON, et al. 2007). Sua ação se dá através da inserção na membrana de células eucarióticas, resultando na formação de poros e consequente destruição destas células (BAUER e WELCH, 1996). A real função desta proteína ainda não está totalmente esclarecida. Porém, relatos sugerem que sua presença pode potencializar os efeitos causados por Stx, uma vez que a lise dos eritrócitos *in vivo* resultaria na liberação do radical heme da hemoglobina, que atuaria como fonte de ferro, estimulando o crescimento de *E. coli* (ZHANG, et al. 2012; NATARO e KAPER, 1998). Também presente em alguns sorotipos de *E. coli*, a subtilase foi primeiramente descrita por PATON et al. (2004), após um pequeno surto de SHU no Sul da Austrália em 1998, tendo como responsável uma cepa de STEC O113:H21. Essa toxina, ao ser injetada em camundongos, produziu extensos danos microvasculares, necrose e trombose em diversos órgãos, incluindo cérebro, rins e fígado, sendo letal para esses animais (PATON et al. 2004).

Ao se tratar da diversidade genética de cepas de STEC, estudos apresentam baixa similaridade entre STEC isoladas de alimentos e isoladas de pacientes. ELHADIDY et al. (2015) comentam que os marcadores de virulência presentes nos isolados de humanos enfermos geralmente estão ausentes nos de alimentos. No entanto, GONZALEZ e CERQUEIRA (2019) afirmam, em sua revisão, que o perfil de virulência dos isolados encontrados no Brasil indica um potencial risco de patogenicidade em seres humanos.

1.2. STEC e Carnes

Ruminantes, especialmente bovinos, são os principais reservatórios de STEC em diferentes países (MENG et al. 2013).

Nos produtos de origem animal, em especial as carnes, a contaminação por STEC está associada principalmente às etapas de abate do animal, como evisceração e processamento pós-abate ou ainda no manuseio em estabelecimentos comerciais (ALONSO, et al. 2012). Além disso, é frequente encontrarmos diferentes tipos de carnes expostas no mesmo ambiente em açougues, onde os equipamentos usados no seu processamento podem ser compartilhados, favorecendo a contaminação cruzada.

Inúmeras são as pesquisas publicadas sobre a presença de STEC em bovinos, tanto em fezes como em carcaças ou produtos derivados. Entre eles, podem ser citados os de MANAGE et al. (2019) no Canadá, TAHA e YASSIN (2019) no Iraque, FURUKAWA et al. (2018) no Japão, VARCASIA et al. (2018) na Itália, SERRANO et al. (2018) na Suíça, STROMBERG et al. (2018) nos Estados Unidos, TORO et al. (2018) no Chile, NOBILI et al. (2017) também na Itália, WASILENKO et al. (2014), MAGWEDERE et al. (2013) e HUSSEIN e BOLLINGER (2005) nos Estados Unidos, BLANCO et al. (2004) na Argentina, e PROCTOR et al. (2002) nos Estados Unidos. No Brasil, tem-se os relatos de CASTRO et al. (2019), SANTOS et al. (2018), BERGAMINI et al. (2017), PERESI et al. (2016), FARAH et al. (2007), VON-LAER et al. (2007) e RIGOBELLO et al. (2006). A quantidade de relatos mantém os bovinos como o principal reservatório e a carne bovina como maior veículo de contaminação de STEC.

Para a carne suína e suínos, o número de pesquisa na área é bem menor: SCOTT et al. (2020) e CHA et al. (2018) nos Estados Unidos, KHAN et al. (2018) na China, BARDASI et al. (2017) na Itália, BAI et al. (2015) na China, BARDASI et al. (2015) na Itália, TROTZ-WILLIAMS et al. (2012) no Canadá, LEE et al. (2009) na Coreia, FANTELLI e STEPHAN (2001) na Suíça e NAKAZAWA, AKIBA e SAMESHIMA (1999) no Japão. No Brasil, não foram encontrados estudos sobre a presença de STEC em carne suína. No entanto, há relatos da presença deste microrganismo no trato urinário e intestino de suínos, como descrito por COSTA et al. (2008), MARTINS et al. (2010) e MARTINS et al. (2013), indicando um potencial risco zoonótico.

1.3. STEC em Frangos

Em relação aos frangos, BEERY et al. (1985), nos Estados Unidos, demonstraram que *E. coli* produtora de toxina Shiga é capaz de colonizar o ceco de aves e ainda ser excretada nas fezes por vários meses. Porém, poucos são os relatos sobre esta bactéria em carne de aves. ALONSO et al. (2012), na Argentina, detectaram STEC em 5% das amostras de frango

analisadas, como carcaças e produtos derivados, como hambúrgueres e miúdos. Estudo realizado por MOMTAZ e JAMSHIDI (2013) revelaram que entre as 422 amostras de frango analisadas no Irã, o sorogrupo O157 prevaleceu entre as amostras positivas de STEC. YOUNIS et al. (2017) encontraram STEC, EPEC e ETEC em carnes de frango destinadas ao consumo de pacientes hospitalizados no Egito.

Apesar de uma prevalência pequena, BAI et al. (2015) reportaram a presença de STEC em uma amostra de carne de frango comercializada no varejo na China e, no mesmo ano, HOANG MINH et al. (2015) encontraram os genes *stx*₁ e *stx*₂ em 17,4% das amostras de frango analisadas assim como observaram a presença de STEC em carne bovina e suína, 19,6% e 23,1%, respectivamente. Adicionalmente, KAGAMBÈGA et al. (2012) relataram 6% de prevalência de STEC em fezes de aves destinadas ao abate em Burkina Faso.

No Brasil, há apenas um relato na literatura consultada envolvendo a presença de STEC em carnes de frango. Porém, essas duas não apresentaram expressão da toxina em teste com células Vero. Há, também relato na área clínica animal, de STEC isolada de aves com celulite e síndrome da cabeça inchada (BERNEDO-NAVARRO et al. 2014).

Os dados apresentados estão representados no mapa da Figura 2 abaixo.

1.4. Surtos

Muitos são os surtos descritos envolvendo o grupo das STEC. A dose infectante da cepa O157:H7 é extremamente baixa (<100 células), mas de outros sorotipos é maior. A transmissão da bactéria ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados, pela manipulação inadequada, por contato pessoa-pessoa e pelo contato direto ou indireto com animais contaminados (HEIMAN et al. 2015).

Segundo a literatura consultada, no período de 2010 a 2019, o sorogrupo O157 ainda aparece como o principal responsável por surtos de origem alimentar, assim como sua presença em carnes cruas e alimentos cárneos (Tabela 1). Os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar, seguido pelo Canadá. No Brasil, até o momento, não foi relatado nenhum surto envolvendo STEC e alimentos de origem animal.

Em relação à carne de frango, há somente um relato de surto envolvendo este alimento indiretamente. WHITTAKER et al. (2009) relataram um surto envolvendo o consumo de *wrap* de frango na Inglaterra. Os autores relatam que não foi possível determinar qual ingrediente causou o surto, ou se foi resultante de uma contaminação cruzada. Da mesma maneira, o CDC

(2015) reportou um surto envolvendo salada com frango. Este surto atingiu 19 pessoas de 7 estados diferentes, e similarmente, o ingrediente contaminado não foi determinado.

A Tabela 1 apresenta alguns surtos ocorridos em diversos países no período de 2010 a 2019 causados pela ingestão de alimentos de origem animal.

1.5. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Assim com STEC, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) também causa lesões do tipo “*attaching and effacing*”, tendo sido com estes microrganismos que pesquisadores observaram a capacidade de promover esse tipo de lesão (NATARO e KAPER, 1998) antes da descoberta de STEC. Como já citado anteriormente, essa lesão está relacionada com a presença do gene *eae*, responsável pela codificação da intimina, proteína envolvida na lesão A/E. EPEC, porém, não apresenta a toxina Stx. Por outro lado, produz uma fimbria do tipo IV denominada *bundle forming pilus* (BFP), que está envolvida na adesão inicial. O gene *bfp* responsável pela expressão desta fimbria encontra-se em um plasmídeo denominado EAF (EPEC *adherence factor*). Esses *pili* são responsáveis pela união das células bacterianas entre si formando agrupamentos celulares, conhecido como adesão localizada (AL), e também pela união da bactéria à célula hospedeira. Na ausência da BFP, há a adesão localizada -like (ALL) quando não há formação dos agrupamentos celulares (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002).

Baseado na presença ou ausência de Bfp, os isolados de EPEC são classificados em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). Os isolados de tEPEC são aqueles que apresentam os genes *eae*, *bfp* mas não *stx* enquanto os de aEPEC são os que apresentam apenas o gene *eae*, não apresentando *bfp* ou *stx* (HERNANDES et al. 2009).

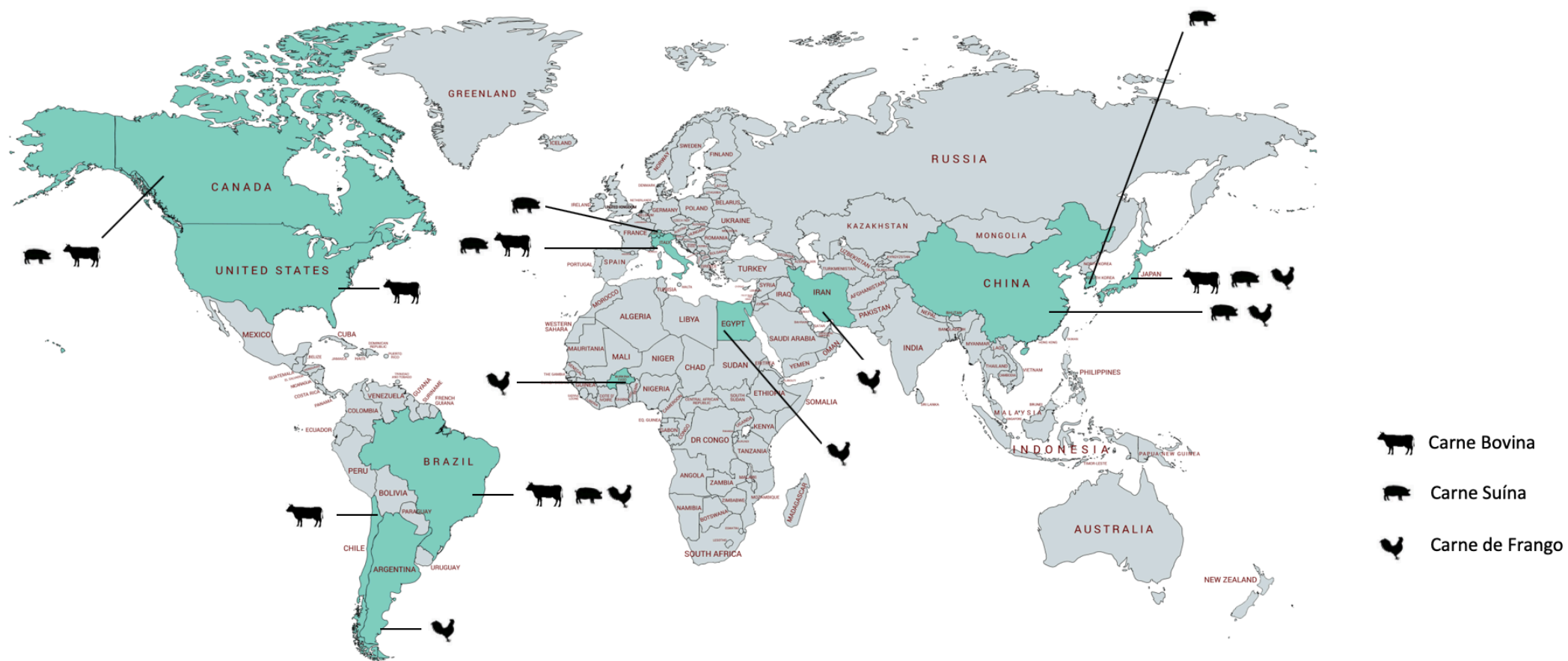
Atualmente a EPEC atípica é importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (YANG et al. 2017; OCHOA e CONTRERAS, 2011). A doença tem como sintomas diarreia, febre e vômito e, em crianças com idade inferior a dois anos, pode ocorrer desidratação e desnutrição (GOMES et al., 2016).

A principal via de transmissão de EPEC é a fecal-oral, mas pode ocorrer também pela ingestão de água e alimentos contaminados. Apesar de já ter sido isolada de alimentos crus e processados (NORAZAH et al., 1998) e de água (SIDHU et al., 2013), poucos são os relatos sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo essa bactéria (YANG et al., 2017), e raramente esse microrganismo aparece nas estatísticas mais completas, como as

publicadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos e pela *European Food Safety Authority* (EFSA).

O Brasil, como maior exportador de carne de aves, enfrenta exigências por parte de países importadores, através de Certificado Sanitário Internacional (CSI) ou de seus requisitos legais, sobre a ocorrência de *E. coli* produtoras de toxina Shiga, difíceis de serem atendidas devido à escassez de dados sobre a presença de STEC em aves. Assim, esta pesquisa pretende fornecer subsídios para futuros trabalhos de avaliação de risco microbiológico sobre a presença desse perigo em carnes de frango, como também fornecer dados científicos aos técnicos das indústrias brasileiras em suas tratativas com importadores.

Figura 2. Algumas ocorrências de STEC reportadas em carne bovina, suína e de frango.



Fonte: Autor

Tabela 1. Alguns surtos causados por *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga envolvendo diversos alimentos de origem animal no período de 2010 a 2019.

Ano	Localização	Número de Casos	Óbitos	SHU	Sorogrupo	Veículo	Referência
2011	Japão	Não relatado	2	-	O111	Carne crua	PROMED, 2010c
2011	França	18	-	18	O157	Carne moída	KING et al. 2014
2012	Finlândia	11	-	4	O157	Leite não pasteurizado	JAAKKONEN et al. 2017
2013	Canadá	29	1	-	O157	Queijo Gouda	CURRIE et al. 2018
2013	Itália e Romênia	25	3	19	O26	Leite	SEVERI et al. 2016
2013	Canadá	7	-	1	O157	Tartare de carne e vitelo	GAULIN et al. 2015
2014	EUA	12	-	-	O157	Carne bovina moída	CDC, 2014
2014	Canadá	119	-	6	O157	Carne de Porco	HONISH et al. 2017
2015	EUA	19	-	2	O157	Salada com frango	CDC, 2015
2015	Inglaterra	15	-	2	O157	Produtos de dois açougues identificados	WILSON et al. 2018
2016	EUA	11	-	1	O157	Produtos cárneos	CDC, 2016
2018	EUA	18	1	-		Carne moída	CDC, 2018b
2019	França	16	-	7	O26	Leite cru	JONES et al. 2019
2019	EUA	209	-	2	O103	Carne bovina moída	CDC, 2019
2019	EUA	33	-	-	O103 e O121	Carne de bisão-americano moída	CDC, 2019c

Fonte: Autor

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em amostras de carcaças e de cortes de frangos provenientes de diferentes plantas de abate, localizadas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil e caracterizar os isolados obtidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença dos fatores de virulência nos isolados de *E. coli* provenientes de aves através da pesquisa dos genes *stx*₁ (e seus subtipos), *stx*₂ (e seus subtipos), *eae*, e *ehx*;
- Identificar os subtipos de Stx;
- Identificar os sorotipos dos isolados de STEC;
- Analisar a diversidade genética dos isolados de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Amostragem

O estudo foi desenvolvido a partir da coleta de amostras de carne de frango provenientes de plantas de abates de aves, destinadas à exportação, localizadas nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, representando as regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil respectivamente, em um total de 200 amostras, obtidas no período de agosto de 2017 a novembro de 2018. Estas amostras foram divididas entre carcaça de frango após o *chiller* (40), peito sem osso e sem pele (40), coxas com pele (40), asa (40) e carne mecanicamente separada (CMS) (40), coletadas em condições assépticas nas linhas de produção, conforme o fluxograma apresentado na Figura 3. Após a coleta, as amostras foram congeladas e enviadas no dia seguinte para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP.

3.2. Métodos

Para análise das amostras foram utilizadas metodologias que tiveram como base a MLG 5B.05 (USDA) e a ISO/TS13136 (2012).

3.2.1 Enriquecimento primário

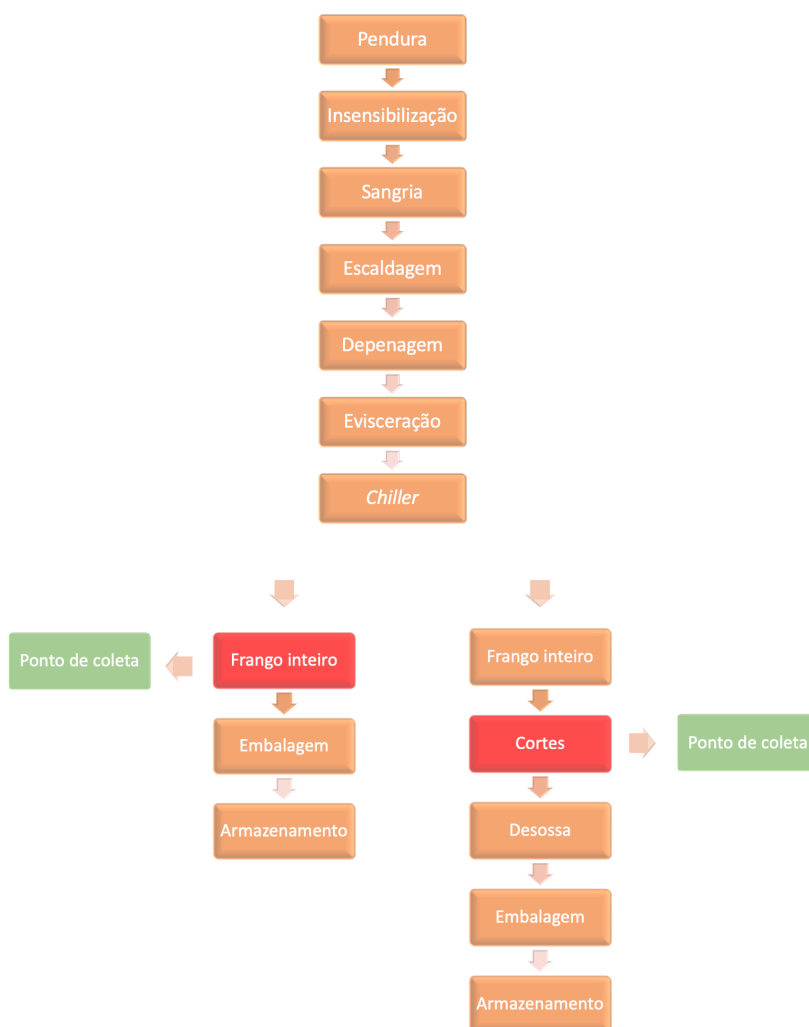
Para a etapa de enriquecimento do método USDA MLG 5B.05, as amostras de carcaças, peito, coxa e asa foram submetidas à rinçagem em caldo triptona soja modificado adicionado de novobiocina (16mg/l) na quantidade de 2 mL/L (mTSB, Oxoid, Basingstoke, UK), em quantidade equivalente ao peso da amostra, e massageadas por 15 min para que os microorganismos aderidos ao produto fossem liberados. Para as amostras de CMS, 25 g do alimento foram adicionados a 225 mL do caldo e, em seguida, homogeneizados em Smasher (AES Laboratoire, BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France).

Para a etapa de enriquecimento do método ISO/TS13136 (2012), as amostras de carcaças, peito, coxa e asa foram submetidas à rinçagem em água peptonada tamponada (BPW,

Kasvi, Italy), em quantidade equivalente ao peso da amostra, e massageadas por 15 min para que os micro-organismos aderidos ao produto fossem liberados. Para as amostras de CMS, 25g do alimento foram adicionados a 225mL de BPW e em seguida homogeneizados.

Em ambos os métodos, 1 mL de caldo de enriquecimento foi retirado após o período de incubação para testes quanto a presença de fragmentos de genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*, através da análise de PCR, segundo as condições e parâmetros descritos na Tabela 2.

Figura 3. Esquema do processo de abate de aves com indicações dos pontos de coleta.



Fonte: Autor

3.2.2. Isolamento de colônias suspeitas

Para isolamento de colônias suspeitas, com o auxílio de uma alça calibrada de 1 μ L estéril, uma alíquota de cada caldo de enriquecimento, após o período de incubação (37°C/24 h), foi semeada em superfície de ágar MacConkey sorbitol adicionado de cefixima na quantidade de 40 μ L/L e telurito de potássio na quantidade de 100 μ L/L (MSCTK, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) e em ágar Rainbow (RBA, Biolog, Hayward, USA) de modo a obter colônias isoladas. Decorrido o período de incubação (37°C/20-24 h), entre 5 e 10 colônias com aspectos característicos de *E. coli* foram selecionadas, onde metade da colônia foi adicionada ao caldo triptona soja (TSB Oxoid, Basingstoke, UK), e a outra metade foi selecionada para a formação de um *pool* de colônias oriundas da mesma placa. Para confirmação bioquímica de *E. coli*, foi utilizado o teste API 20E (Analytical Profile Index, Biomérieux, USA).

3.2.3 Reação de PCR para pesquisa dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehx* de STEC

O DNA das amostras oriundas da etapa de enriquecimento foi extraído através do kit extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen).

Os *pools* contendo de 5 a 10 colônias suspeitas foram submetidos à extração de DNA por fervura de acordo com o método descrito por DE MEDICI et al. (2003). Os *pools* que apresentaram positividade na PCR tiveram suas colônias testadas individualmente. Nesta etapa, o DNA dos isolados foi extraído utilizando o kit extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen).

Na Tabela 2 estão descritos os *primers*, seus respectivos amplicons e as condições de reação usados neste estudo. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems, ThermoFischer, USA). Para as reações Multiplex, foram utilizadas as condições descritas por FENG e MONDAY (2000) e pelo Método ISO/TS13136. Paralelamente, os isolados também foram submetidos à PCR com os *primers* e condições descritos por SCHEUTZ et al. (2012) para detecção dos genes *stx*₁ e *stx*₂. A partir dos isolados de *E. coli* positivos para *stx*, foi realizada a pesquisa da sequência de *ehxA* através da análise de PCR descrita por SCHIMIDT et al. (1995), disponíveis na Tabela 2.

A revelação dos produtos da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (Certified™ Molecular Biology Agarose, Invitrogen Carlsbad, USA, Bio-rad

Laboratories Inc. USA), na concentração de 1,5%. As condições de corrida foram: 110 V por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (89 nM Tris-Borato e 2 mM EDTA pH 8.0). Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA ladder 100 pares de base (Invitrogen, Carlsbad, USA). O gel foi corado com Sybr™ Safe (1µL/10mL) e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta - 320 nm (Bio-rad Laboratories Inc. Hercules, USA).

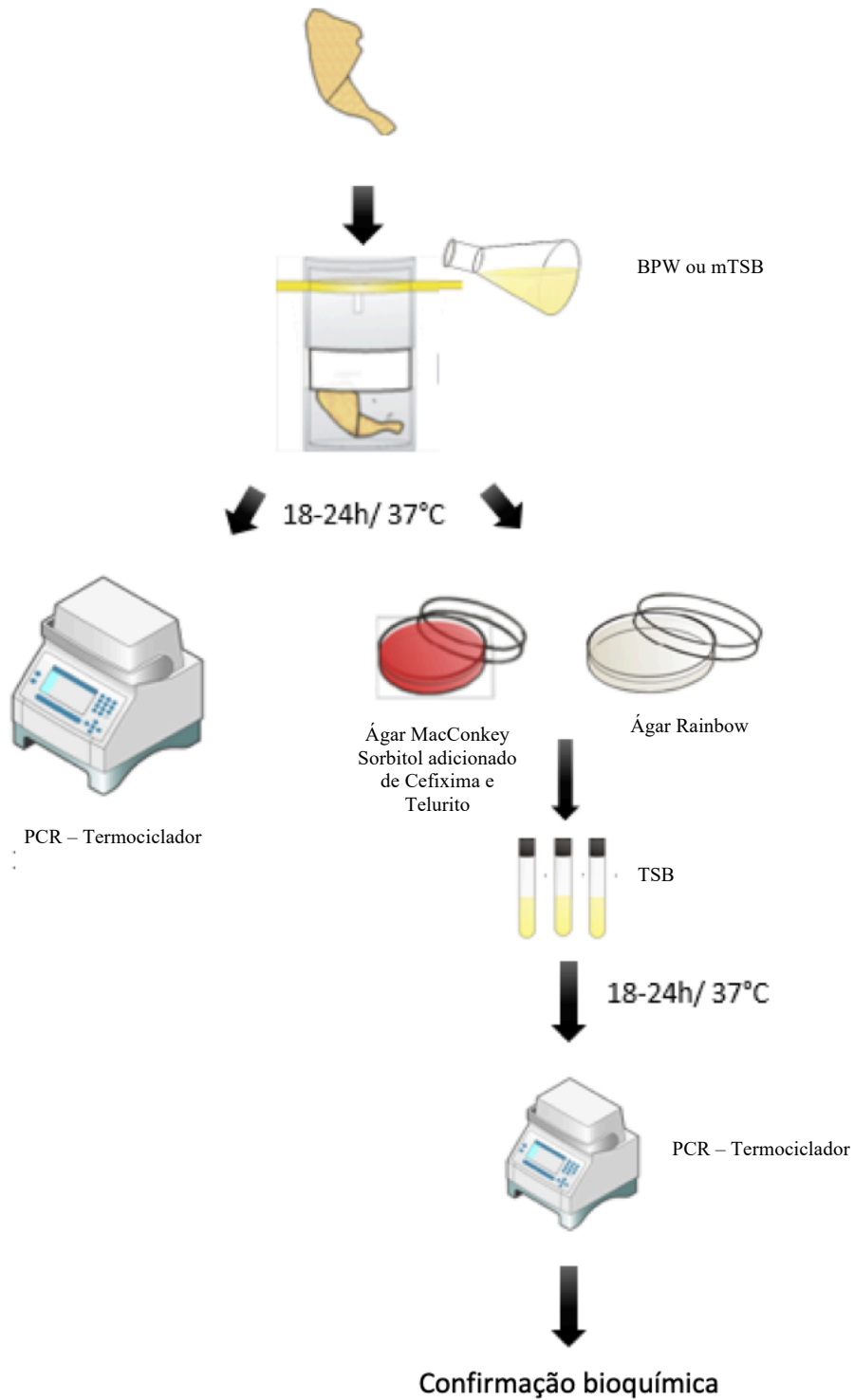
Nesta etapa não foi utilizado o equipamento BAX, como descrito na metodologia USDA MLG5B.05, nem a etapa de PCR em tempo real, conforme descrito em ISO/TS13136 (2012). O fluxograma da análise está apresentado na Figura 4.

3.2.4. Análise dos genes de virulência por sequenciamento de fragmentos específicos (Sanger)

Para as amostras que apresentaram o gene *stx*, foi realizado o sequenciamento de fragmentos específicos (Sanger). Os amplificados foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Em seguida, foram ajustados à concentração de 15 ng/µL para os amplificados positivos para *stx*₁, e 20ng/µL para os amplificados positivos para *stx*₂. Os amplificados purificados foram acondicionados em microtubos de 200 µL estéreis na quantidade de 5 µL, adicionados de 2,5 µL dos *primers Forward* ou *Reverse*, na concentração de 5 ng/µL.

A reação final foi encaminhada para análise de sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os resultados recebidos foram analisados no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e posteriormente a sequência foi conferida no Blast (ALTSCHUL et al. 1990). As sequências de referência usadas para cada subtipo de Stx e seus números de acesso no GenBank estão apresentados na Tabela 3.

Figura 4. Fluxograma de análise aplicado nas amostras de carcaça e de carne de frango.



Fonte: Autor

Tabela 2. Sequências iniciadoras e condições utilizadas nos ensaios de PCR

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de reação			Referência
			Desnaturação (°C/s)	Anelamento (°C/s)	Extensão (°C/s)	
<i>stx</i> ₁	*F: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG **R: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	94/60	56/60	72/60	FENG e MONDAY, 2000
<i>stx</i> ₂	F: ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG R: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584	94/60	56/60	72/60	FENG e MONDAY, 2000
<i>eae</i>	F: ATTACCATCCACACAGACGGT R: ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	397	94/60	56/60	72/60	FENG e MONDAY, 2000
<i>stx</i> ₁	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	95/60	65/120*	72/90	ISO/TS 13136, 2012
<i>stx</i> ₂	F: GGCCTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	95/60	65/120*	72/90	ISO/TS 13136, 2012
<i>eae</i>	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAACAAGAGG	384	95/60	65/120*	72/90	ISO/TS 13136, 2012
<i>stx</i> ₁	F: GTACGGGGATGCAGATAAATCGC R: AGCAGTCATTACATAAGAACYCCACT F4: GGCCTGTCTGAAACTGCTCCTGT	209	95/50	56/40	72/60	SCHEUTZ et al. 2012
<i>stx</i> ₂	R1: ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC F4-f: CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT R1-e/f: TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	625-627	95/50	56/40	72/60	SCHEUTZ et al. 2012
<i>ehxA</i>	F: GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG R: TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA	1551	94/30	57/ 90	72/ 90	SCHMIDT et al. 1995

O157 (<i>rfb</i>)	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259	95/15	50/15	72/30	PATON & PATON, 1998
<i>fliC</i> (H7)	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC R: CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	95/15	50/15	72/30	GANNON et al. 1997
O26 (<i>wxz</i>)	F: CGCGACGGCAGAGAAAATT R: AGCAGGCTTTTATATTCTCCA	135	94/40	53/60	72/90	PERELLE et al. 2004
O45 (<i>wzxI</i>)	F: CCGGGTTTCGATTTGTGAAGGTTG R: CACAACAGCCACTACTAGGCAGAA	527	95/15	60/60	72/30	DEBROY et al. 2005
O103 (<i>wzx</i>)	F: CAAGGTGATTACGAAAATGCA R: GAAAAAAGCACCCCGTACTT	99	94/40	53/60	72/90	PERELLE et al. 2004
O111 (<i>wzy</i>)	F: GATAAACCAATGCTCCTATCA R: CTTTTTTTGAACCTACAGCAA	204	94/40	53/ 60	72/ 90	O'HANLON et al. 2004
O121 (<i>wzxI</i>)	F: AGGCGCTGTTTGGTCTCTTA R: TCGCTACCGCTAATGATTCC	310	94/40	57/60	72/13	FRATAMICO et al. 2003
O145 (<i>lhpI</i>)	F: GCCGCCGCAATGCTTGCGATA R: CGATAATATTTACCCACCAG	132	94/40	53/60	72/90	PERELLE et al. 2004

Tabela 3. Cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga e seus respectivos números de acesso usados para análise de subtipo.

CEPA	N. DE ACESSO (GENBANK)
O157:H7 str. Sakai	BA000007
295/00	AJ312232
MHI813	AY170851
G5506	EF441619
928/91	EF441578
EH250	AF043627
031	X65949
E32511	M59432
020324	AY739670 & AY739671
B2F1	AF479828
E-D 53	X81416
P27	AJ249351
H.I.8.	M29153
#S-8	AB048227
FHI 1106-1092	AM904726
S134	AJ966783

3.2.5 Diversidade Genética

3.2.5.1. ERIC-PCR

A amplificação das sequências intergênicas consensus repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) foi utilizada para determinar a relação clonal dos isolados identificados. Para isso, foram utilizados o iniciador ERIC (5'-CAGCCATGAACAACCTGGTGGCG-3') e a metodologia descrita por VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI (1991). As condições utilizadas na amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min e 72°C por 8 min e ainda uma etapa final de extensão a 72°C por 16 min. Os produtos foram separados em gel de agarose 2% com Sybr™ Safe (0,5µl/ml), e corrente constante de 80V, por 3,5 horas. Os fragmentos foram visualizados em fotodocumentador (Gel Doc XR System || Bio-Rad) e analisados pelo software Bionumerics V. 7.5

(Applied Maths NV, Keistraat, Belgium), utilizando análise de cluster através do índice de similaridade de dados e média de grupos de pares não ponderada (UPGMA). Os padrões de banda foram comparados com otimização de 1% e tolerância de posição de banda de 1%..

3.2.5.2. PFGE

A Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE) foi conduzida em 14 isolados de *E. coli* positivos para o gene *stx* tendo o teste sido realizado de acordo com PulseNet International (2017). De maneira breve, os isolados foram enriquecidos em TSB a 37°C/18 h. A concentração de células bacterianas foi ajustada por diluição com o tampão de suspensão de células (CSB) para o valor OD variando entre 0.8–1.0 em um comprimento de onda de 600 nm no espectrofotômetro Ultrospec® 2000 (Pharmacia Biotech Inc). As células foram lisadas e o genoma intacto foi digerido em 10U/mg da enzima de restrição XbaI (New England Biolabs, Ipswich, MA) por aproximadamente 2 h a 37°C. Os fragmentos foram separados pelo Sistema CHEF DR-III Pulsed-Field Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com as seguintes condições e reagentes: 1% SeaKem Gold agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME) em 0.5% Tampão Tris-borate EDTA, à temperatura de 14 °C, voltagem em 6 V/cm, tempo de corrida de 19 h. O marcador “universal” padrão PulseNet, *S. enterica* serovar Braenderup H9812 foi usada como marcador molecular de referência. O gel foi corado com Sybr™ Safe, descorado com água MiliQ, e o DNA visualizado através do transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories). O gel de PFGE foi analisado pelo software Bionumerics V. 7.5 (Applied Maths NV, Keistraat, Belgium), utilizando análise de cluster através do índice de similaridade de dados e média de grupos de pares não ponderada (UPGMA). Os padrões de banda foram comparados com otimização de 1% e tolerância de posição de banda de 1%.

3.2.6 Sorotipagem

A determinação sorológica dos isolados de *E. coli* produtora de toxina de Shiga foi realizada por PCR de acordo com os *primers*, amplicons e condições de reação citados na Tabela 2, com as respectivas referências.

Paralelamente, os isolados confirmados como STEC foram encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz para determinação do sorotipo, uma vez que os *primers* utilizados não abrangem todos os sorogrupos de STEC.

3.2.7. Caracterização de *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Para os isolados que apresentaram apenas o gene *eae*, foi realizada uma análise de PCR para a diferenciação entre *E. coli* e *E. albertii*, de acordo com o descrito por LINDSEY et al. (2017). Os *primers* e condições utilizadas estão apresentados na Tabela 4.

Aqueles positivos para *E. coli* foram submetidos à análise para verificar a presença da sequência *bfpA*. As condições de reação de PCR e a sequência de *primers* utilizados foram descritos por GUNZBURG, TORNIÉPORTH e RILEY (1995) e estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências iniciadoras e condições utilizadas nos ensaios de PCR

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de reação			Referência
			Desnaturação (°C/s)	Anelamento (°C/s)	Extensão (°C/s)	
<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC R: GCCGCTTTA TCCAACCTGGTA	326	94/30	56/60	72/120	GUNZBURG, TORNIEPORTH e RILEY, 1995
<i>E. coli cdgR</i>	F: CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA R: GCTATTTCCCTGCCGATAAGAGA	212	92/60	57/60	72/30	LINDSEY et al. 2017
<i>E. albertii KF1</i>	F: AGTGTAGAGTATATTGGCAACTTC R: GTAAATAATGCTGGTCAGACGTTA	393	92/60	57/60	72/30	LINDSEY et al. 2017

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de sequências para stx_1 , stx_2 e eae

Das 200 amostras analisadas, duas (1%) foram consideradas positivas presuntivas por terem apresentado resultado positivo a partir do caldo de enriquecimento, sendo uma amostra de CMS com STEC apresentando genes $stx_1 + eae$ (a partir do BPW), de Mato Grosso de Sul, e uma amostra de coxa de frango com genes $stx_2 + eae$ (a partir do mTSB), proveniente do Paraná.

Treze (6,5%) das 200 amostras foram positivas para o gene stx_1 ou stx_2 e uma delas apresentou ambos os genes, porém, em isolados distintos. Dessas 13 (6,5%) amostras positivas, 3 (23,1%) eram de carcaças inteiras, 1 (7,7%) de asa, 2 (15,4%) de cortes de coxa, 4 (30,7%) amostras de peito e 3 (23,1%) de carne mecanicamente separada (CMS). Essas amostras positivas foram coletadas no Paraná [5 (38,5%)], São Paulo [3 (23%)], Mato Grosso do Sul [3 (23%)] e Santa Catarina [2 (15,5%)]. Estes resultados podem ser encontrados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. A Tabela 5 apresenta informações detalhadas de cada isolado de STEC encontrado neste estudo.

Além disso, 51 (25,5%) amostras foram positivas apenas para o gene eae . Destas, 13 (25,5%) correspondiam a carcaças inteiras, 8 (15,7%) a cortes de asa, 12 (23,5%) a cortes de coxa, 13 (25,5%) a cortes de peito e 5 (9,8%) a carne mecanicamente separada (CMS). Estas vieram do Paraná (14; 27,5%), Santa Catarina (8; 15,7%), São Paulo (17; 33,3%) e Mato Grosso do Sul (12; 23,5%). Estes resultados podem ser encontrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Nenhum dos 15 isolados apresentou stx e eae , concomitantemente, como também não apresentou o gene para o fator de virulência enterohemolisina (Ehx).

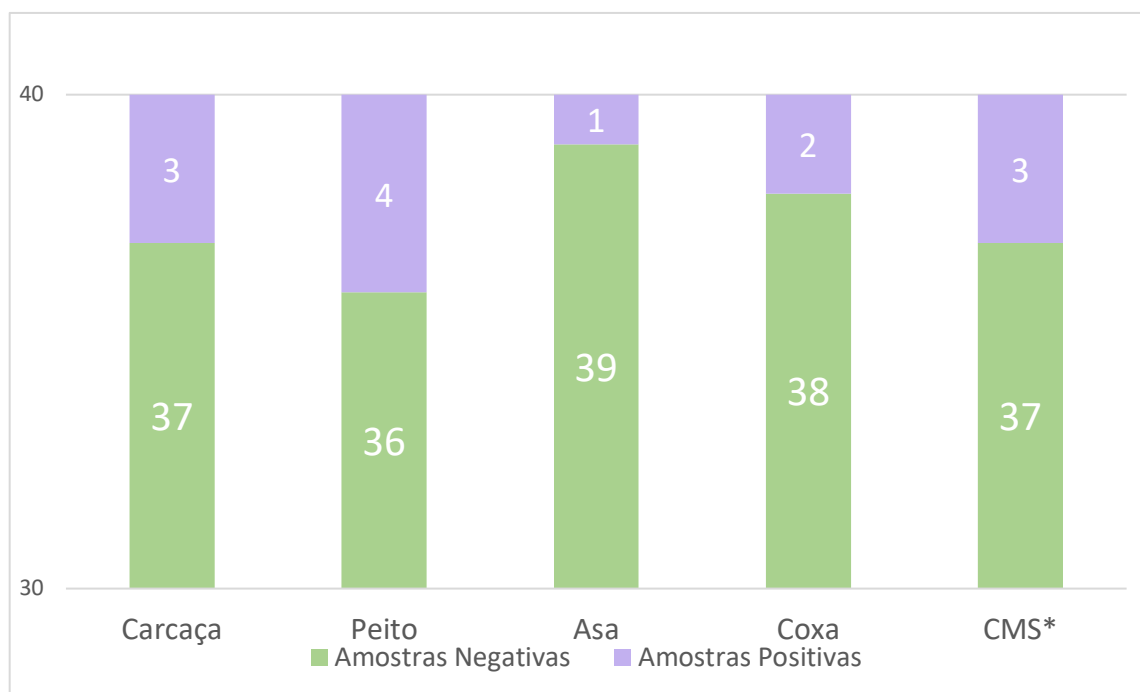
Tabela 5. Perfil de virulência, sorotipo, estado de origem e data de coleta das amostras positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga.

AMOSTRA	NÚMERO DO ISOLADO	<i>stx</i> _{1a}	<i>stx</i> _{2e}	<i>stx</i> _{2f}	<i>eae</i>	<i>ehx</i>	SOROTIPO	ORIGEM	DATA DE COLETA
CARCAÇA	1095	-	+	-	-	-	O4:H4	PARANÁ	29/08/17
COXA	1649	-	+	-	-	-	O5:H11	SANTA CATARINA	03/10/17
CMS*	1748	-	-	+	-	-	ONT:HNM	SANTA CATARINA	19/09/17
PEITO	2319	+	-	-	-	-	O45:HNM	PARANÁ	05/09/17
COXA	2323	+	-	-	-	-	O45:HNM	PARANÁ	05/09/17
CARCAÇA	2712	+	-	-	-	-	ONT:H4	SÃO PAULO	15/09/17
PEITO	2912	+	-	-	-	-	O86:H10	MATO GROSSO DO SUL	30/08/17
CARCAÇA	2418	-	-	+	-	-	ONT:H11	PARANÁ	22/08/17
PEITO	2433	-	-	+	-	-	ONT:H7	SÃO PAULO	04/09/17
CMS*	2435	-	+	-	-	-	OR:H12	PARANÁ	22/08/17
ASA	2672	-	-	+	-	-	O8:H51	SÃO PAULO	12/11/18
CARCAÇA	2749	-	-	+	-	-	O9:H51	SÃO PAULO	15/09/17
PEITO	2788	-	-	+	-	-	O8:HNM	MATO GROSSO DO SUL	18/04/18
CMS*	3155	-	-	+	-	-	O114:H4	MATO GROSSO DO SUL	22/08/17
CMS*	3159	-	-	+	-	-	O114:H4	MATO GROSSO DO SUL	22/08/17

*CMS: Carne Mecanicamente Separada

Fonte: Autor

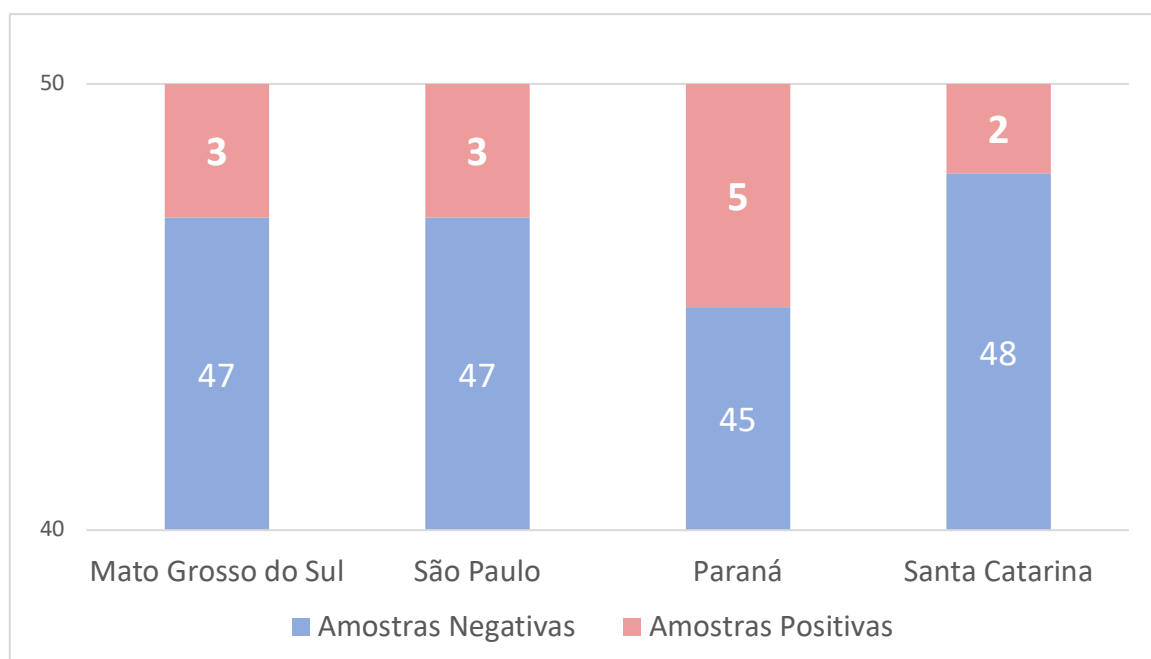
Figura 5. Número de amostras positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga por número total de amostras de frango analisada.



*CMS: Carne Mecanicamente Separada

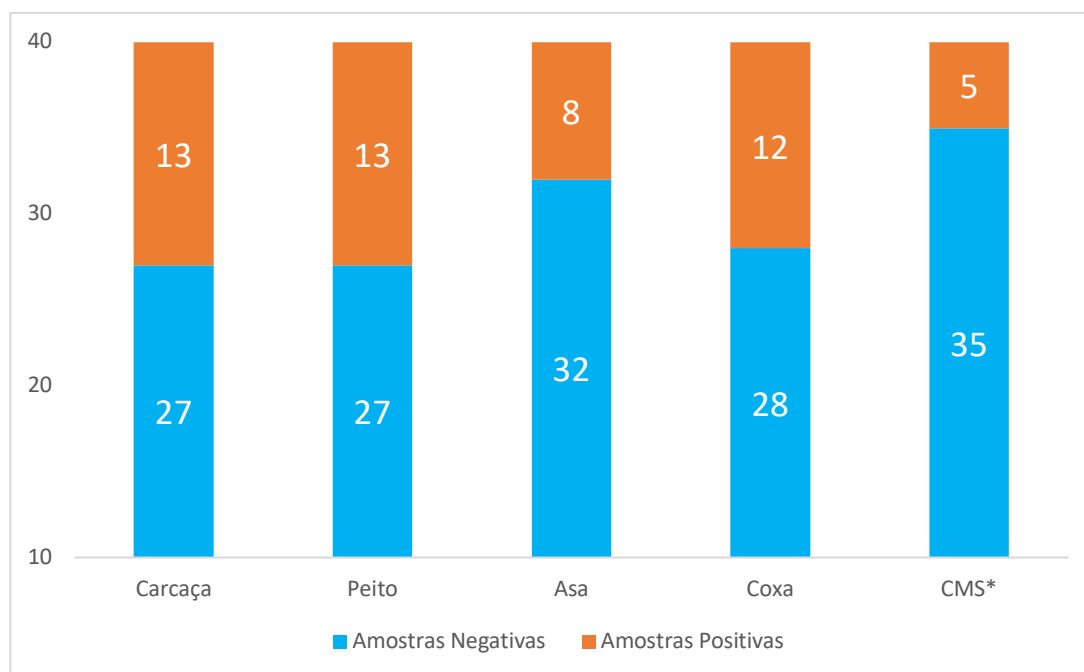
Fonte: Autor

Figura 6. Número de amostras de carcaça e cortes de frango positivas para *E. coli* produtora de toxina de Shiga por estado em que foram coletadas.



Fonte: Autor

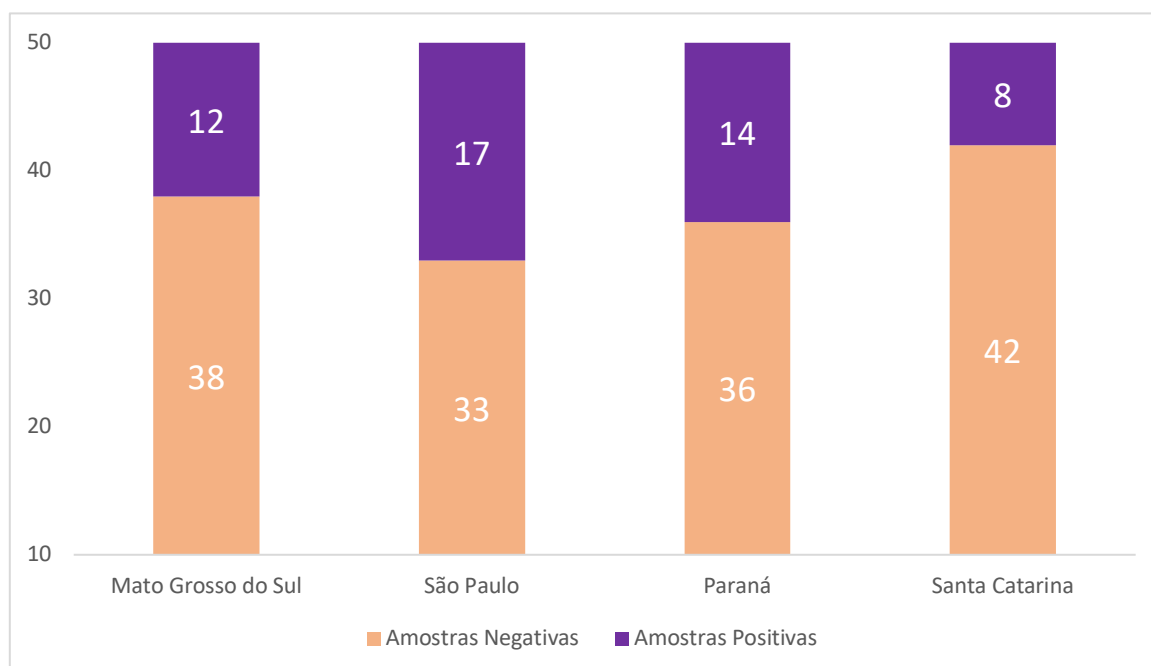
Figura 7. Número de amostras positivas para o gene *eae* por número total de amostras de frango analisada.



*CMS: Carne Mecanicamente Separada

Fonte: Autor

Figura 8. Número de amostras de carcaça e cortes de frango positivas para o gene *eae* por estado em que foram coletadas.



Fonte: Autor

4.2. Identificação dos subtipos de stx_1 e stx_2 através do sequenciamento por Sanger

Os 14 isolados positivos para Stx foram encaminhados para confirmação da presença de stx e seus subtipos. Um dos isolados apresentou problemas na amplificação e não gerou resultado satisfatório, enquanto os outros 13 isolados apresentaram sequências para stx_1 [4 (30,8%)] e stx_2 [9 (69,2%)], representando 12 amostras. Os subtipos identificados foram stx_{1a} 4 (30,8%) isolados, stx_{2e} 3 (23,1%) isolados e stx_{2f} 6 (46,1%) isolados. Esses resultados podem ser encontrados na Tabela 5.

4.3. Sorotipagem

Nenhum dos isolados de STEC apresentou positividade nas reações de PCR para o sorotipo O157:H7 ou para os sorogrupos O26, O103, O111, O121 e O145, do chamado grupo “*Big Six*”.

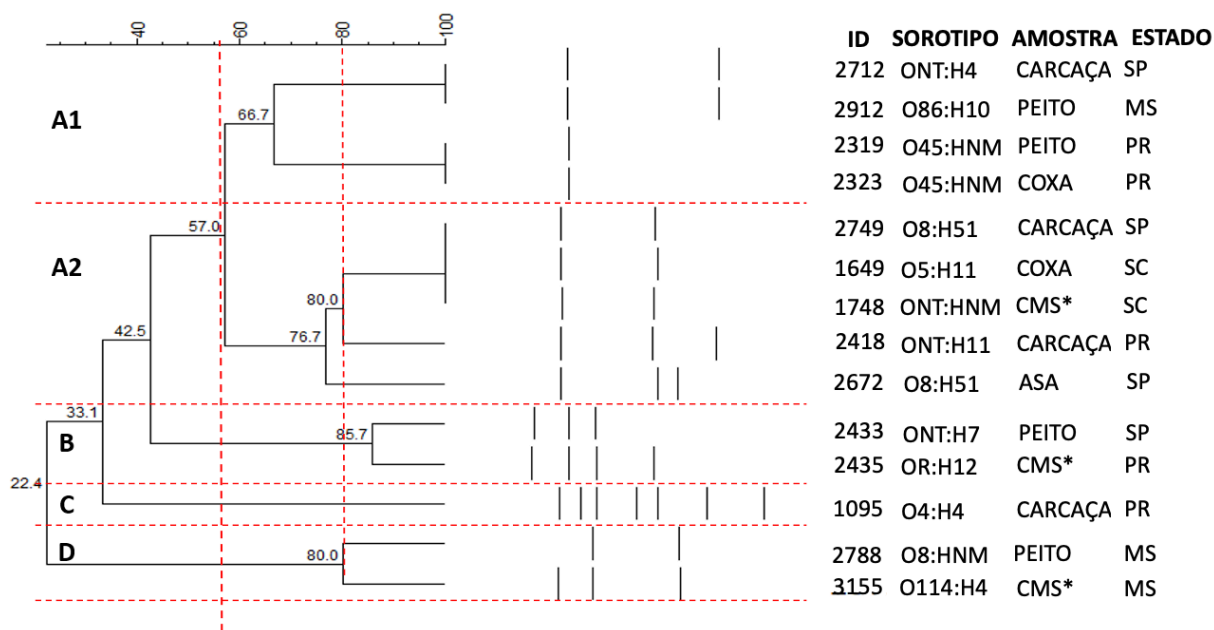
Na Tabela 5 encontram-se os resultados da sorologia realizada no Instituto Adolfo Lutz. Observa-se a presença do sorogrupo O45 em dois isolados provenientes de duas amostras (peito e coxa) que apresentaram o gene stx_1 .

4.4. ERIC-PCR

As cepas isoladas de carcaças e carne de frango foram agrupadas em quatro clusters, em uma faixa de corte de 80%, disponíveis na Figura 7;

- Cluster A com nove cepas, assim distribuídas: isoladas de peito (1), coxa (1) e carcaça (1) provenientes do Paraná; duas de carcaça e uma de asa provenientes de São Paulo; uma coxa e uma de CMS de Santa Catarina e uma de peito, coletada em Mato Grosso do Sul;
- Cluster B com duas cepas, sendo uma de peito, amostra coletada em São Paulo e outra de CMS coletada no Paraná;
- Cluster C com uma cepa isolada de carcaça, proveniente do Paraná;
- Cluster D com duas cepas, sendo uma isolada de peito e uma de CMS, ambas as amostras coletadas em Mato Grosso do Sul.

Figura 9. Dendrograma baseado no padrão de ERIC-PCR das cepas de *E. coli* produtora de toxina de Shiga isoladas de carcaças e cortes de carne de frango.

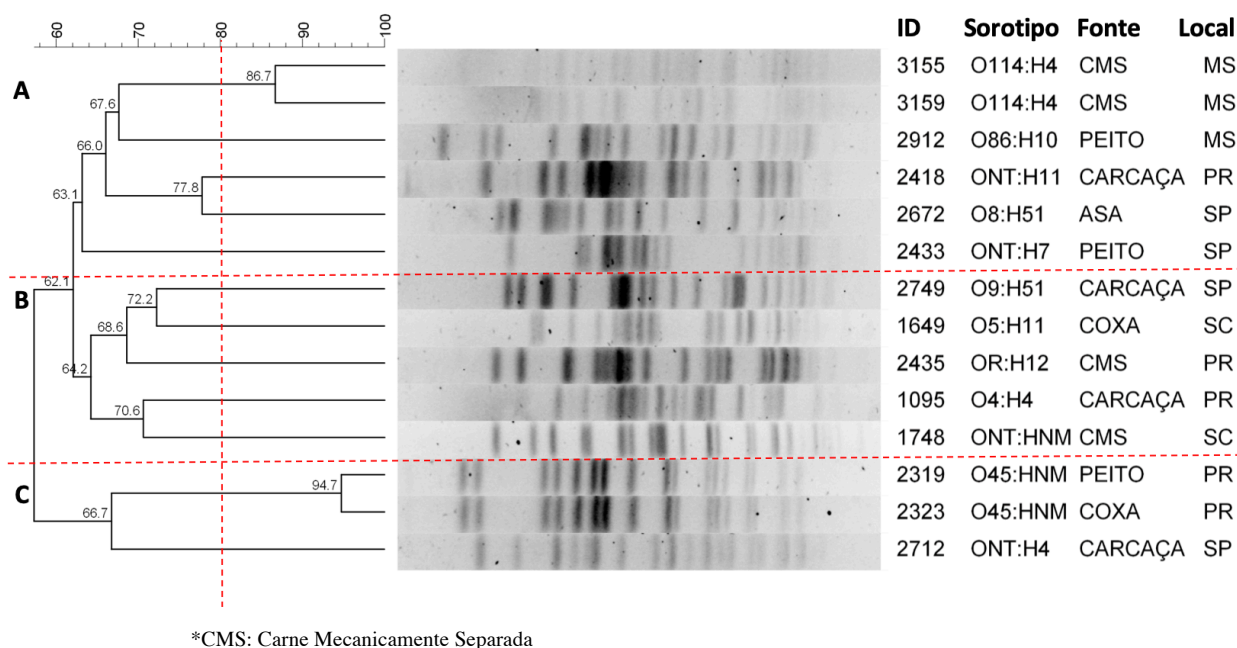


Fonte: Autor

4.5. PFGE

As cepas isoladas de carcaça e cortes de frango foram agrupadas pelo PFGE em três clusters, em uma faixa de corte de 80%. O cluster A foi composto por seis cepas, cujas amostras vieram do Paraná (1), São Paulo (2), e Mato Grosso do Sul (3); o cluster B foi composto por cinco cepas, cujas amostras vieram de São Paulo (1), Paraná (2) e Santa Catarina (2) e o cluster C foi composto por três, cujas amostras vieram do Paraná (2) e São Paulo (1). A maior similaridade pode ser observada entre as cepas isoladas de peito (isolado número 2319) e de coxa (isolado número 2323), coletadas no Paraná, com um grau de 94,7% de similaridade, e também nas amostras de CMS (isolados números 3155 e 3159) coletadas no Mato Grosso do Sul, com 86,7% em grau de similaridade.

Figura 10. Dendrograma baseado no padrão de PFGE das cepas de *E. coli* produtora de toxina de Shiga isoladas de carcaças e cortes de carne de frango.



Fonte: Autor

4.6. Caracterização de *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Uma vez que cepas de *E. albertii* também podem carrear o gene *eae*, foi feita a diferenciação entre *E. coli* e *E. albertii*. Dos 130 isolados portadores desse gene, 119 foram identificados como *E. coli*, representando 49 (24,5%) amostras, sendo 13 (26,5%) de carcaças, sete (14,3%) de asa, 12 (24,5%) de peito, 12 (24,5%) de coxa e cinco (10,2%) de CMS. Os 11 isolados, identificados como *E. albertii*, foram isolados de sete (3,5%) amostras, sendo duas (28,5%) de carcaça, uma (14,2%) de asa, duas (28,5%) de peito, uma (14,2%) de coxa e uma (14,2%) de CMS.

Apenas três (6,1%) das 49 amostras positivas para *E. coli* apresentaram isolados com amplicon de 326 pb para o gene *bfp*, sendo uma amostra de peito enviada do Paraná e duas de São Paulo, uma de carcaça e a outra de asa. A identificação deste gene indica a presença de EPEC típica.

5. DISCUSSÃO

O Brasil é um país internacionalmente consolidado na produção e exportação de produtos de origem animal. Dentre estes, destaca-se a carne de frango que, além de apresentar números expressivos na exportação (4,212 milhões de toneladas) para o mercado externo, também é a carne mais consumida pelos brasileiros, chegando a 42kg/*per capita* anualmente (ABPA, 2019). Nesse sentido, torna-se importante avaliar o risco para a saúde humana associado à presença de patógenos neste alimento. Em relação a *E. coli* produtora de toxina de Shiga, estudos acerca da sua presença nesta carne não são comuns, uma vez que a maior prevalência se dá em carne bovina.

Nesta pesquisa, foi identificada a presença dos genes *stx*₁ e *stx*₂ no *screening* inicial em duas (1%) amostras. Esse resultado é menor do que o relatado por HOANG MINH et al. (2015), no Japão, em que esses genes foram detectados, presuntivamente, em 4/27 (17,4%) amostras, assim distribuídos: duas (8,7%) amostras positivas para *stx*₁, três (13,0%) para *stx*₂ e uma amostra (4,3%) para os dois genes. No entanto, os autores não tiveram sucesso no isolamento de STEC. A baixa detecção presuntiva neste estudo pode estar relacionada com a metodologia utilizada (PCR convencional) que pode não ser tão sensível em amostras com alta carga microbiana quando comparada à metodologia recomendada (PCR em tempo real). O emprego da análise recomendada poderia fornecer resultados mais próximos à quantidade de amostras identificadas como positivas.

No presente estudo, de 3345 isolados testados, apenas 15 (0,44%) foram positivos para *E. coli* produtora de toxina de Shiga. Esses isolados foram provenientes de 13 amostras representando 6,5% das analisadas, porcentagem essa maior do que a encontrada por ALONSO et al. (2012) na Argentina, onde 3,3% das amostras de carcaças apresentaram positividade para os genes *stx*₁ e *stx*₂. Os resultados, porém, são menores quando comparados à taxa de positividade relatada em hambúrgeres de frango (10,3%). Também na Argentina, CHINEN et al. (2009) concluíram que 10,3% das amostras de carcaças de frango apresentavam-se contaminadas com STEC e 7,5% delas continham o microrganismo com o mesmo perfil de virulência. Esse nível de contaminação é maior do que o encontrado em nosso estudo, ao contrário do relatado por BAGHERI, GHANBARPOUR e ALIZADE (2014), no Irã, em que apenas 2/102 amostras de carcaças (1,96%) apresentaram o gene *stx*₂, resultado este que difere daquele aqui relatado, onde se verificou a presença de ambos os genes, *stx*₁ e *stx*₂, nas amostras analisadas.

YOUNIS et al. (2017), no Egito, observaram isolados de STEC contendo mais de um gene *stx*. Além disso, o isolado O26 apresentou os três principais genes de interesse para STEC: *stx*₁, *stx*₂ e *eae*. No presente estudo, os isolados encontrados apresentaram apenas um dos genes de interesse, *stx*₁ ou *stx*₂. Nenhum dos isolados apresentou a combinação de dois genes *stx* ou, ainda, *stx* + *eae*, indicando um baixo potencial patogênico destas cepas.

No Brasil, apenas o estudo de GONZALEZ et al. (2000) relata duas amostras positivas para STEC em carcaças de frango, sendo uma apresentando o gene *stx*₂ e outra os genes *stx*₂ e *eae*, não pertencentes aos sete sorogrupos de maior importância atualmente. Por outro lado, TANABE et al. (2019) não observaram a presença de STEC nas 103 amostras de frango analisadas assim como RISTORI et al. (2017) nas 32 amostras estudadas.

O corte que apresentou a maior ocorrência de STEC foi o peito do frango, representando 30,7% do total de amostras positivas. O resultado obtido pode estar relacionado com a baixa carga microbiana presente em um peito sem pele, facilitando a detecção de estirpes de STEC. Este dado é de extrema importância, uma vez que o peito do frango é um produto que tem grande aceitação por parte do consumidor, devido ao seu alto teor de proteína (22,50 g) (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA, 2019) e baixo teor de gordura, quando comparado aos outros cortes de frango comercializados no Brasil.

Apenas dois isolados identificados como STEC vieram do mesmo enriquecimento com resultado positivo, confirmando assim a análise de detecção presuntiva. Um segundo enriquecimento testado como positivo não teve confirmação quando semeado em ágar para isolamento, ou seja, não foi possível obter o microrganismo alvo, confirmando dados da literatura acerca da dificuldade do isolamento de STEC (HOANG MINH et al. (2015).

A detecção de *E. coli* produtora de toxina de Shiga nos alimentos é dificultada por vários fatores, entre eles: (i) o patógeno geralmente está em menor número quando comparado à microbiota natural de alimentos; (ii) métodos de detecção requerem protocolos específicos que possam diferenciar STEC de outras *E. coli* não-patogênicas; (iii) a existência de inúmeros meios de enriquecimento que favorecem a multiplicação de determinado sorogrupo em detrimento de outros; (iv) a existência de inúmeros meios de cultura para isolamento que também favorecem determinados sorogrupos; (v) mesmo com o emprego de “beads”, estas são específicas para determinados sorogrupos, o que leva ao não isolamento de colônias de outros sorogrupos.

Na presente pesquisa foram utilizadas duas metodologias: uma que utiliza caldo de enriquecimento com antibiótico (USDA FSIS) e outra cujo caldo de enriquecimento não é adicionado de agente seletivo (ISO). A presença de antibiótico já nesta etapa, apesar de inibir a

microbiota natural do alimento, pode também inibir cepas de STEC presentes no alimento assim como os agentes seletivos utilizados nos meios para isolamento. O ágar MacConkey Sorbitol adicionado de telurito de K e cefixima é considerado um bom meio para o isolamento de STEC, mas neste estudo foram isoladas apenas 34% das colônias identificadas quando comparado com o meio Rainbow no qual foram isoladas 66%.

Em relação aos subtipos de Stx, 100% (4) dos isolados carreadores de *stx*₁ foram positivos para o subtipo *stx*_{1a}, enquanto para os isolados positivos para *stx*₂, 33% (3) foram positivos para o subtipo *stx*_{2e} e 67% (6) o foram para o subtipo *stx*_{2f}. De acordo com LEONARD et al. (2016), o subtipo *stx*_{1a} está ligado a diversos casos graves de doenças em humanos. Já os subtipos *stx*_{2e} e *stx*_{2f} detectados corroboram a afirmação de MELTON-CELSA (2014) que afirmam serem estes majoritariamente encontrados em animais.

NEWTON et al. (2009) afirmam que a maior parte dos sorogrupos de STEC relacionada ao desenvolvimento de doenças possuem o gene *Ehx* responsável pela produção de enterohemolisina. Nenhuma das amostras analisadas neste estudo apresentou o gene em questão.

Todos os sorotipos encontrados no presente estudo já foram associados à doença em seres humanos, segundo a FAO/WHO (2019). Além disso, podemos destacar a presença de dois isolados pertencentes ao sorogrupo O45, membro do chamado “*Big six*”, que incorpora seis sorogrupos de STEC não-O157 mais prevalentes em doenças em seres humanos (CROXEN et al. 2013). Cepas de STEC não-O157 são responsáveis por causar em torno de 112 mil casos de infecções anualmente nos Estados Unidos e elas já foram relacionadas com casos de SHU de grande impacto em países como Alemanha, Áustria, Austrália, Itália, Argentina e Dinamarca (ELDER et al. 2016; SCALLAN et al. 2011). No entanto, apesar dos isolados obtidos neste estudo apresentarem sorotipos previamente relacionados a doenças em seres humanos, seu perfil de virulência não condiz com perfis de isolados clínicos relatados na literatura (MOMTAZ et al. 2013; ELHADIDY et al. 2015).

Observou-se na diversidade genotípica a formação de quatro clusters pela ERIC-PCR (A, B, C e D) e três clusters pela PFGE. Na técnica ERIC-PCR foi possível observar a formação de três grupos clonais, com cepas provenientes de diferentes estados. O primeiro grupo contém duas cepas isoladas de carcaça (2712) e peito (2912) provenientes de Mato Grosso do Sul e São Paulo, respectivamente, carreadoras do gene *stx*₁ e pertencentes a sorogrupos diferentes (ONT e O86, respectivamente). O segundo grupo clonal contém duas cepas - peito (2319) e coxa (2323) - vindas do Paraná, carreadoras do gene *stx*₁ pertencentes ao sorogrupo O45, e o terceiro grupo

contém três cepas isoladas de carcaça (2749), coxa (1649) e CMS (1748) coletadas em abatedouros de São Paulo e Santa Catarina, carreadoras do gene *stx*₂ pertencentes a sorogrupos diferentes (O9, O5 e ONT, respectivamente). A partir destas informações é possível observar que há diferenças genéticas no perfil de STEC isoladas de carne de frango. É importante ressaltar que mesmo sendo um número restrito de cepas, é possível observar a existência de três grupos clonais sendo que dois estão circulando em diferentes estados (MS e SP; SC e SP) e o terceiro, aparentemente, endêmico no Paraná.

Por outro lado, a PFGE, padrão ouro devido ao seu poder discriminatório, apresentou em seus resultados maior diversidade genética. Apenas as cepas do mesmo sorotipo apresentaram relação genética significativa, acima de 85%. As cepas de números 3155 e 3159 (sorotipo O114:H4) foram isoladas da mesma amostra de CMS, no Mato Grosso do Sul, enquanto as de números 2319 e 2323 (sorotipo O45:HNM), pertencentes a cortes diferentes, peito e coxa, respectivamente, foram coletados no Paraná, no mesmo dia. Esta informação referente ao dia da coleta nos leva à hipótese de que estes cortes podem ser provenientes de animais do mesmo lote. As demais cepas (10) apresentaram baixa similaridade corroborando estudos anteriores que relatam grande diversidade genética em STEC isoladas de diferentes fontes, pertencentes ou não a um mesmo sorogrupo (EKLUND et al. 2001; VAZ et al. 2006; JU et al., 2012; DOUELLOU et al. 2016).

Entre os abatedouros, um número maior de amostras positivas foi observado no estado do Paraná, seguido por São Paulo e Mato Grosso do Sul que apresentaram a mesma ocorrência, e Santa Catarina com menor ocorrência. Esta variação na detecção pode estar relacionada a diversos fatores das plantas de abate como, por exemplo, tamanho da planta, design, equipamentos, velocidade no abate, localização geográfica, local de espera dos animais, lote, origem dos animais, treinamento do pessoal, entre outros. É importante ressaltar, ainda, que um único animal ou equipamento contaminado pode transferir o microrganismo para outras carcaças e cortes durante o processo de abate por contaminação cruzada, através da contaminação de utensílios ou ambientes por onde circulam as carcaças ou cortes, transferindo assim de um alimento para outro (ETCHEVERRÍA et al. 2010).

No presente estudo, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) também foi detectada, caracterizada pela presença do gene *eae* e ausência do gene *stx*, responsável por causar diarreia, principalmente em crianças menores de 2 anos. Este patotipo de *E. coli* foi detectado, na presente pesquisa, em 24,5% das amostras de carne de frango, valor superior ao observado, na Argentina, por ALONSO et al. (2016), que a detectaram em 11,4% das amostras de frango

analisadas. A percentagem obtida neste estudo também é superior ao encontrado por GONZALEZ et al. (2000), no Brasil, quando 2,1% das amostras de frango foram positivas para EPEC. A caracterização de EPEC típica e atípica também apresentou divergências em relação aos estudos de ALONSO et al. (2016) e TANABE et al. (2019) uma vez que obtivemos três (2,5%) isolados de EPEC típica e 116 (97,5%) de EPEC atípica, resultado este contrário aos relatados pelos autores previamente mencionados que não detectaram EPEC típica.

A epidemiologia das diarreias causadas por EPEC mudou ao longo dos anos. No Brasil, por exemplo, a prevalência das diarreias infantis entre 1998 e 1999 causada por tEPEC (SCALETSKY et al., 2009) era de 38,9%, porém em estudo realizado com isolados de 2001 - 2002 em Salvador, Bahia, foi observado que 92% eram de aEPEC (FRANZOLIN et al., 2005). Apesar de diversos relatos sobre a presença de EPEC em fezes diarreicas infantis (TARDELLI et al., 2016), seu papel como agente etiológico não está totalmente esclarecido, uma vez que a percentagem de detecção é similar em pacientes com e sem diarreia (HU e TORRES, 2015). O alimento como veículo desse patógeno também não está definido, uma vez que os surtos são raros ou não relatados. Como os mais afetados são crianças com idade inferior a dois anos, água contaminada é um importante veículo. Os dados deste trabalho são uma importante contribuição, pois mostram que a carne de frango pode ser um veículo de transmissão de EPEC típica e atípica.

Resultado não menos importante são os 11 isolados identificados como *E. albertii*, microrganismo que também pode carrear o gene *eae* (LINDSEY et al. 2017). Sua identificação é um desafio, uma vez que o perfil bioquímico possui similaridades com *E. coli* (ORI et al. 2019) e, além disso, foi identificada como responsável por surto de gastroenterite em um restaurante no Japão (OOKA et al. 2013). Outra característica importante é que esta bactéria possui a capacidade de incorporar o gene *stx*, responsável pela produção da toxina de Shiga, podendo assim causar enfermidades ainda mais sérias (ORI et al. 2019).

No Brasil, esta bactéria representa apenas uma pequena proporção das cepas circulantes causadoras de diarreias, porém, é importante que lhe seja dada a devida atenção nos programas de vigilância, para que seja possível estimar sua evolução e circulação (ORI et al. 2018).

Muitos são os patógenos que podem estar presentes no alimento. Neste trabalho, observa-se a circulação de *E. coli* produtora de toxina de Shiga, *E. coli* enteropatogênica e *E. albertii* na produção de carne de frango em larga escala no Brasil. Na agropecuária, a transformação de produções pequenas e familiares para a larga escala industrial aumenta a

densidade animal, facilitando, conseqüentemente, a transmissão da bactéria mais rapidamente, assim como a contaminação do ambiente. KARMALI (2018) ressalta que aspectos como fatores socioeconômicos, hábitos de vida e susceptibilidade do hospedeiro também são de grande importância no que tange à saúde pública, aumentando ou diminuindo o risco de exposição do consumidor ao patógeno.

Dado o cenário no qual o Brasil está inserido, sendo um dos maiores produtores de frango e o maior exportador dessa carne, além da grande aceitação desse produto pelo mercado interno, a detecção de STEC e EPEC nessa carne reforça a necessidade das boas práticas de produção e manipulação (GMP) e aplicação de uma APPCC adequada ao longo da cadeia produtiva.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados gerados no presente trabalho e da sua discussão, podemos concluir que:

- Foram isoladas cepas de STEC não-O157 de carcaça e cortes de frango;
- Duas cepas isoladas de peito e coxa apresentaram o mesmo gene *stx_{1a}* e pertencem ao sorogrupo O45, membro do grupo *Big Six*, importante causador de síndrome hemolítica urêmica;
- Apesar da diversidade de padrões de PFGE observada, algumas cepas apresentaram alta similaridade como as pertencentes ao sorogrupo O45 e, em menor grau, O114;
- Foram isoladas cepas de *E. coli* enteropatogênica e de *Escherichia albertii*, também consideradas patogênicas.

A partir desses dados, pode-se concluir que a ocorrência de STEC não-O157 em amostras de carcaça e cortes de frango em abatedouros é uma realidade e que cuidados devem ser redobrados no controle durante o abate das aves para impedir a contaminação ou disseminação. Esses dados são inéditos, considerando-se a matriz alimentar estudada e o número amostral. Além disso, a presença de STEC O45 e demais sorogrupos, assim como de EPEC, podem ser considerados um risco à saúde do consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações brasileiras de carne bovina fecham 2018 com recorde histórico. [online] p.1-2. Available at: <http://www.abiec.com.br/download/exportacoes%20fecham%20com%20recorde.pdf>. 2019.
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2019**. [online] São Paulo, p.3-160. Available at: <http://cleandrodias.com.br/wp-content/uploads/2019/05/RELATO%C3%ACRIO-ANUAL-ABPA-2019.pdf>. 2019.
- ALONSO, M. N. Z.; LUCCHESI, P. M. A.; RODRIGUEZ, E. M.; PARMA, A. E.; PADOLA, N. L. Enteropathogenic (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, v. 23, p. 351-355, 2012.
- ALONSO, M., SANZ, M., IRINO, K., KRÜGER, A., LUCCHESI, P. E PADOLA, N. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken-derived products. **British Poultry Science**, v. 57, n. 2, p. 161-164, 2016.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215 p. 403-410, 1990.
- BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 16-20, 2014.
- BAI, X., FU, S., ZHANG, J., FAN, R., XU, Y., SUN, H., HE, X., XU, J. E XIONG, Y. Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.
- BAI, X., WANG, H., XIN, Y., WEI, R., TANG, X., ZHAO, A., SUN, H., ZHANG, W., WANG, Y., XU, Y., ZHANG, Z., LI, Q., XU, J. E XIONG, Y. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 31-38, 2015.
- BARDASI, L., TADDEI, R., FIOCCHI, I., PELLICONI, M. F., RAMINI, M., TOSCHI, E. E MERIALDI, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in slaughtered pigs and pork products. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 2, p. 79-82, 2017.
- BARDASI, L., TADDEI, R., NOCERA, L., RICCHI, M. E MERIALDI, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013. **Italian Journal of Food Safety**, v. 4, n. 1, 2015.
- BAUER, M. e WELCH, R. Characterization of an RTX Toxin from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 64, p.167-175, 1996.
- BEERY, J. T.; DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 310-315, Fev, 1985.

- BERGAMINI, A. M. M., SIMÕES, M., IRINO, K., GOMES, T. A. T. E GUTH, B. E. C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 553-556, 2007.
- BERNEDO-NAVARRO, R., MIYACHIRO, M., CONCEIÇÃO, R. e YANO, T. Non-O157:H7 avian pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from lesions on broiler chickens in Brazil. **Microbiology and Immunology**, v. 58, p. 266-266, Abr, 2014.
- BLANCO, M., PADOLA, N. L., KRUGER, A., SANZ, M. E., BLANCO, J. E., GONZALEZ, E. A., DAHBI, G., MORA, A., BERNÁRDEZ, M. I., ETCHEVERRÍA, A. I., ARROYO, G. H., LUCCHESI, P. M. A., PARMA, A. E. AND BLANCO, J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. **International Microbiology**, v. 7, p. 269-276, 2004.
- BOERLIN, P., MCEWEN, S., BOERLIN-PETZOLD, F., WILSON, J., JOHNSON, R. e GYLES, C. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 497-503, 1999.
- BRUYAND, M., MARIANI-KURKDJIAN, P., GOUALI, M., DE VALK, H., KING, L., LE HELLO, S., BONACORSI, S. AND LOIRAT, C. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 3, p. 167-174, 2018.
- CASTRO, V. S., TEIXEIRA, L. A. C., RODRIGUES, D. D. P., DOS SANTOS, L. F., CONTE-JUNIOR, C. A. AND FIGUEIREDO, E. E. D. S. Occurrence and antimicrobial resistance of *E. coli* non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1117-1123, 2019.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ground Beef (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2014/o157h7-05-14/index.html>. 2014. Acessado 29 de Outubro de 2019.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Costco Rotisserie Chicken Salad (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o157h7-11-15/index.html>. 2015. Acessado 29 de Outubro de 2019.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate Outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Chipotle Mexican Grill Restaurants (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o26-11-15/index.html>. 2015b. Acessado 29 de Outubro de 2019.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Beef Products Produced by Adams Farm (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2016/o157h7-09-16/index.html>. 2016. Acessado 29 de Outubro de 2019. \
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Beef. <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o26-09-18/index.html>. 2018b. Acessado 29 de Outubro de 2019.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Beef. <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o103-04-19/index.html>. 2019. Acessado 29 de Outubro de 2019.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Bison Produced by Northfork Bison Distributions, Inc. <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/bison-07-19/index.html>. 2019c. Acessado 29 de Outubro de 2019.

CHA, W., FRATAMICO, P. M., RUTH, L. E., BOWMAN, A. S., NOLTING, J. M., MANNING, S. D. E 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.

COOKSON, A., BENNETT, J., THOMSON-CARTER, F. e ATTWOOD, G. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 6360-6369, 2007.

CHINEN, I., EPSZTEYN, S., MELAMED, C. L., AGUERRE, L., MARTÍNEZ ESPINOSA, E., MOTTER, M. M., BASCHKIER, A., MANFREDI, E., MILIWEBSKY, E. E RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 167-171, 2009.

COSTA, M. M. D., DRESCHER, G., MABONI, F., WEBER, S., BOTTON, S. D. A., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, I. S. E VARGAS, A. C. D. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 741-743, 2008.

CROXEN, M., LAW, R., SCHOLZ, R., KEENEY, K., WLODARSKA, M. e FINLAY, B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), p.822-880, 2013.

CURRIE, A., GALANIS, E., CHACON, P. A., MURRAY, R., WILCOTT, L., KIRKBY, P., HONISH, L., FRANKLIN, K., FARBER, J., PARKER, R., SHYNG, S., SHARMA, D., TSCHETTER, L., HOANG, L., CHUI, L., PACAGNELLA, A., WONG, J., PRITCHARD, J., KERR, A., TAYLOR, M., MAH, V., FLINT, J. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Aged Raw Milk Gouda Cheese, Canada, 2013. **Journal of Food Protection**, v.81, n.2, p. 325-331, 2018.

DE MEDICI, D., CROCI, L., DELIBATO, E., DI PASQUALE, S., FILETICI, E. E TOTI, L. 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**, v. 69, n. 6, p. 3456-3461, 2003.

DEBROY, C., FRATAMICO, P., ROBERTS, E., DAVIS, M. e LIU, Y. Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of *Escherichia coli* O45 and O55 serogroups. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4919-4924, 2005.

DONNENBERG, MICHAEL S.FINLAY, B. BRETT. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 317-319, 2013.

DOREGIRAEI, F., ALEBOUYEH, M., FASAEI, B., CHARKHKAR, S., TAJEDIN, E. and REZA ZALI, M. Isolation of atypical enteropathogenic and Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* strains from poultry in Tehran, Iran. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, p. 53-57, 2016.

DOUËLLOU, T., DELANNOY, S., GANET, S., MARIANI-KURKDJIAN, P., FACH, P., LOUKIADIS, E., MONTEL, M. AND THEVENOT-SERGEANT, D. DOUËLLOU, T., DELANNOY, S. GANET, S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products — Genetic diversity and virulence gene profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 52-62, 2016.

ELDER, J. R., BUGAREL, M., DEN BAKKER, H. C., LONERAGAN, G. H. e NIGHTINGALE, K. K. Interrogation of single nucleotide polymorphisms in *gnd* provides a novel method for molecular serogrouping of clinically important Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) targeted by regulation in the United States, including the “big six” non-O157 STEC and STEC O157. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p. 85-93, 2016.

ELHADIDY, M., ELKHATIB, W. F., ELFADL, E. A. A., VERSTRAETE, K., DENAYER, S., BARBAU-PIEDNOIR, E., DE ZUTTER, L., VERHAEGEN, B., DE RAUW, K., PIÉRARD, D., DE REU, K. E HEYNDRICKX, M. Genetic diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 recovered from human and food sources. **Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 112-119, 2015.

EKLUND, M., SCHEUTZ, F. E SIITONEN, A. Clinical Isolates of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Serotypes, Virulence Characteristics, and Molecular Profiles of Strains of the Same Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2829-2834, 2001.

ETCHEVERRÍA, A.I.; PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J.; RODRÍGUEZ, E.M.; TARABORELLI, A.L.; BALLERIO, M.; PARMA, A.E. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. **Meat Science**, v. 86, p.418- 421, 2010.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1-2, p. 63-69, 2001.

FARAH, S., DE SOUZA, E., PEDROSA, F., IRINO, K., DA SILVA, L., RIGO, L., STEFFENS, M., PIGATTO, C. AND FADEL-PICHETH, C. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

FAO and WHO. **Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods**. Microbiological Risk Assessment Series No. 32. Rome. 74 p. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2019.

FENG, P., MONDAY, S. R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 333-337, 2000.

FRATAMICO, P., BRIGGS, C., NEEDLE, D., CHEN, C. e DEBROY, C. Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O121 by

- PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3379-3383, 2003.
- FURUKAWA, I., SUZUKI, M., MASAOKA, T., NAKAJIMA, N., MITANI, E., TASAKA, M., TERANISHI, H., MATSUMOTO, Y., KOIZUMI, M., OGAWA, A., OOTA, Y., HOMMA, S., SASAKI, K., SATOH, H., SATO, K., MUTO, S., ANAN, Y. E KUROKI, T. Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Minced Meat Cutlets Consumption in Kanagawa, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 71, p. 436-441, 2018.
- GAILLOT, O., THEVENOT-SERGENTET, D., BINGEN, E., CHAUD, P. E DE VALK, H. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 12, p. O1136-O1144, 2014.
- GANNON, V. P. J., D' SOUZA, S., GRAHAM, T., KING, R. K., THAN, K., READ, S. Use of flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification os enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 656-662, 1997.
- GAULIN, C., RAMSAY, D., CATFORD, A. E BEKAL, S. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with the Consumption of Beef and Veal Tartares in the Province of Quebec, Canada, in 2013. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 7, p. 612-618, 2015.
- GOMES, T. A. T., ELIAS, W. P., SCALETSKY, I. C. A., GUTH, B. E. C., RODRIGUES, J. F., PIAZZA, R. M. F., FERREIRA, L. C. S. AND MARTINEZ, M. A. GOMES, T A T, ELIAS, W PSCALETSKY, I C A et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.
- GONZALEZ, A. G. M. E CERQUEIRA, A. M. F. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-15, 2019.
- GONZALEZ, A. G., ROSA, A. C., ANDRADE, J. R. E TIBANA, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 321-328, 2000.
- GOULD, L. H., MODY, R. K., ONG, K. L., CLOGHER, P., CRONQUIST, A. B., GARMAN, K. N., LATHROP, S., MEDUS, C., SPINA, N. L., WEBB, T. H., WHITE, P. L., WYMORE, K., GIERKE, R. E., MAHON, B. E. AND GRIFFIN, FOR THE EMERGING INFECTION, P. M. Increased Recognition of Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in the United States During 2000–2010: Epidemiologic Features and Comparison with *E. coli* O157 Infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 5, p. 453-460, 2013.
- GUNZBURG, S., TORNIEPORTH, N. and RILEY, L. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.1375–1377, 1995.
- GUTH, B. E. C. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). **Microbiologia**. 6th ed. São Paulo: Trabuasi, L. R. e Alterthum F., 2015.

- HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98, 1999.
- HEIMAN, K. E., MODY, R. K., JOHNSON, S. D., GRIFFIN, P. M. E GOULD, L. H. *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1293-1301, 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, p. 137–149, 2009.
- HOANG MINH, S., KIMURA, E., HOANG MINH, D., HONJOH, K. E MIYAMOTO, T. Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 3, p. 114-122, 2015.
- HONISH, L., PUNJA, N., NUNN, S., NELSON, D., HISLOP, N., GOSSELIN, G., STASHKO, N. E DITTRICH, D. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Contaminated Pork Products — Alberta, Canada, July–October 2014: **Morbidity and Mortality Weekly Report**. [s.l: s.n.]. 2017. Acesso em: 9 out. 2019.
- HU J., TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 21, n. 8, p. 729-734, 2015.
- HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. **Meat Science**, v. 71, p. 676–689, Out 2005.
- ISO/TS 13136. **Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.** v. 1, p. 1–22, 2012.
- JAAKKONEN, A., SALMENLINNA, S., RIMHANEN-FINNE, R., LUNDSTRÖM, H., HEINIKAINEN, S., HAKKINEN, M. E HALLANVUO, S. Severe Outbreak of Sorbitol-Fermenting *Escherichia coli* O157 via Unpasteurized Milk and Farm Visits, Finland 2012. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 6, p. 468-475, 2017.
- JONES, G., LEFÈVRE, S., DONGUY, M., NISAVANH, A., TERPANT, G., FOUGÈRE, E., VAISSIÈRE, E., GUINARD, A., MAILLES, A., DE VALK, H., FILA, M., TANNÉ, C., LE BORGNE, C., WEILL, F., BONACORSI, S., JOURDAN-DA SILVA, N. E MARIANI-KURKDJIAN, P. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 22, 2019.
- JU, W., CAO, G., RUMP, L., STRAIN, E., LUO, Y., TIMME, R., ALLARD, M., ZHAO, S., BROWN, E. E MENG, J. Phylogenetic Analysis of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains by Whole-Genome Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4123-4127, 2012.
- KAGAMBÈGA, A., MARTIKAINEN, O., SIITONEN, A., TRAORÉ, A. S., BARRO, N. E HAUKKA, K. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of

slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. **Microbiology Open**, v. 1, n. 3, p. 276-284, 2012.

KARMALI, M. Factors in the emergence of serious human infections associated with highly pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 8, p. 1067-1072, 2018.

KHAN, S. B., ZOU, G., XIAO, R., CHENG, Y., REHMAN, Z. U., ALI, S., MEMON, A. M., FAHAD, S., AHMAD, I. E ZHOU, R. Prevalence, quantification and isolation of pathogenic Shiga toxin *Escherichia coli* O157:H7 along the production and supply chain of pork around Hubei Province of China. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 93-99, 2018.

KING, L., LOUKIADIS, E., MARIANI-KURKDJIAN, P., HAEGHEBAERT, S., WEILL, F., BALIERE, C., GANET, S., GOUALI, M., VAILLANT, V., PIHIER, N., CALLON, H., NOVO, R.,

KOTLOFF, K. L., NATARO, J. P., BLACKWELDER, W. C., NASRIN, D., FARAG, T. H., PANCHALINGAM, S., WU, Y., SOW, S. O., SUR, D., BREIMAN, R. F., FARUQUE, A. S., ZAIDI, A. K., SAHA, D., ALONSO, P. L., TAMBOURA, B., SANOGO, D., ONWUCHEKWA, U., MANNA, B., RAMAMURTHY, T., KANUNGO, S., OCHIENG, J. B., OMORE, R., OUNDO, J. O., HOSSAIN, A., DAS, S. K., AHMED, S., QURESHI, S., QUADRI, F., ADEGBOLA, R. A., ANTONIO, M., HOSSAIN, M. J., AKINSOLA, A., MANDOMANDO, I., NHAMPOSSA, T., ACÁCIO, S., BISWAS, K., O'REILLY, C. E., MINTZ, E. D., BERKELEY, L. Y., MUHSEN, K., SOMMERFELT, H., ROBINS-BROWNE, R. M. AND LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

LEE, G. Y., JANG, H. I., HWANG, I. G. E RHEE, M. S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 196-200, 2009.

LACHER, D. W., GANGIREDLA, J., PATEL, I., ELKINS, C. A. E FENG, P. C. H. Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 10, p. 1656-1662, 2016.

LEONARD, S., MAMMEL, M., LACHER, D. e ELKINS, C. Strain-Level Discrimination of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Spinach Using Metagenomic Sequencing. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p.1-21, 2016.

LINDSEY, R. L., GARCIA-TOLEDO, L., FASULO, D., GLADNEY, L. E STROCKBINE, N. Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 140, p. 1-4, 2017.

MAGWEDERE, K. DANG H. A., MILLS, E.W., CUTTER, C. N., ROBERTS E. L., DEBROY C. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 25, p. 254-258, 2013.

- MANAGE, D. P., LAUZON, J., JONES, C. M., WARD, P. J., PILARSKI, L. M., PILARSKI, P. M. E MCMULLEN, L. M. Detection of pathogenic *Escherichia coli* on potentially contaminated beef carcasses using cassette PCR and conventional PCR. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 2019.
- MARTINS, R. P., DA SILVA, M. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L. E LEITE, D. D. S. Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 437-440, 2013.
- MARTINS, R. P., DA SILVA, M. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L. E LEITE, D. D. S. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 02, p. 123-127, 2010.
- MCDANIEL, T., JARVIS, K., DONNENBERG, M. e KAPER, J. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p.1664-1668, 1995.
- MELTON-CELSA, A. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 2(4), p.1-21, 2014.
- MENG, J.; LEFEUNE, J. T.; ZHAO, T. DOYLE, M. P. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4th ed. Washington, DC: Doyler, M. P. and Beuchat R. L., p. 287-309, 2013.
- MOMTAZ, H., DEHKORDI, F., HOSSEINI, M., SARSHAR, M. AND HEIDARI, M. Serogroups, virulence genes and antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic pediatric patients in Iran. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 39, 2013.
- MOMTAZ, H.; JAMSHIDI, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Iran: serogroups, virulence factors, and antimicrobial resistance properties. **Poultry Science**, v. 92, p. 1305-1313, 2013.
- MORA, F. X., AVILÉS-REYES, R. X., GUERRERO-LATORRE, L. AND FERNÁNDEZ-MOREIRA, E. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in children under five years old with diarrhea in Quito (Ecuador). **International Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 157-160, 2016.
- NAKAZAWA, M.; AKIBA, M.; SAMESHIMA, T. Swine as a Potential Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 833-834, 1999.
- NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NEWELL, D.; LA RAGIONE, R. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 49-71, 2018.
- NEWTON, H. J., SLOAN, J., BULACH, D. M., SEEMANN, T., ALLISON, C. C., TAUSCHEK, M., ROBINS-BROWNE, R. M., PATON, J. C., WHITTAM, T. S., PATON, A. W. E HARTLAND, E. L. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. **Emerging Infectious Diseases**, 15(3), p.372-380, 2009.

NGUYEN, R. N., TAYLOR, L. S., TAUSCHEK, M. AND ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection and Prolonged Diarrhea in Children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 597-603, 2006.

NISA, S., SCANLON, K. M., & DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Escherichia Coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis**, 2nd edition, pp. 75–119, 2013.

NOBILI, G., FRANCONIERI, I., LA BELLA, G., BASANISI, M. G. AND LA SALANDRA, G. Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from raw beef in southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 201-205, 2017.

NORAZAH, A., RAHIZAN, I., ZAINULDIN, T., ROHANI, M. Y. AND KAMEL, A. G. M. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked food. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 29, n. 1, p. 91-93, 1998.

OCHOA, T. J. e CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 478–483, 2011.

O'HANLON, K. A.; CATARAME, T. M. G.; DUFFY, G.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. Rapid detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1013–1023, 2004.

OOKA T.; TOKUOKA E.; FURUKAWA M.; NAGAMURA T.; OGURA Y.; ARISAWA K.; HARADA S.; HAYASHI T.; Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan. **Emerging Infectious Disease**, v. 19, n. 1, p. 144-146, 2013.

PAPE, L., HARTMANN, H., BANGE, F., SUERBAUM, S., BUELTMANN, E. e AHLENSTIEL-GRUNOW, T. Eculizumab in typical hemolytic uremic syndrome (HUS) with neurological involvement. **Medicine**, v. 94, p. 1-6, 2015.

PATON, A. W., PATON, J. C. 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**, v. 36, p. 598-602, 1998.

PATON, A., SRIMANOTE, P., WOODROW, M. e PATON, J. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PATON, A., SRIMANOTE, P., TALBOT, U., WANG, H. e PATON, J. A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 35–46, 2004.

PENNINGTON, H. *Escherichia coli* O157. **The Lancet**, v. 376, p. 1428-1435, 2010.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, M. Detection by 50-nuclease PCR of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7 associated with the world's most frequent clinical cases. **Journal of Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 185–192, 2004.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; VAZ, T.M.I.; HERNANDES, R.T.; TEIXEIRA, I.S.C.; SILVA, S.I.L.; GRACIANO, R.A.S.; PINHEIRO, S.R.; DOS SANTOS, L.F. Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. **Food Control**. v. 63, p. 165–170, 2016.

PROCTOR, M. E., KURZYNSKI, T., KOSCHMANN, C., ARCHER, J. R. AND DAVIS, J. P. Isolated from Patients during an Outbreak of Disease Associated with Ground Beef: Importance of Evaluating Multiple Colonies from an Outbreak-Associated Product. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1530-1533, 2002.

ProMED - Program for Monitoring Emerging Diseases, PRO/AH/EDR> E. coli VTEC non-O157 - Japan: O111, raw beef, alert. Disponível em <<http://www.promedmail.org>>. 2010, Acessado em 15 de setembro de 2018.

PulseNet International. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017. Available at: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>

RIGOBELLO, E.C.; STELLA, A.E.; ÁVILA, F.A.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v. 110, p. 194–198, 2006.

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. E COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308 n.12, p.681-685, 1983.

RISTORI, C. A., ROWLANDS, R. E. G., MARTINS, C. G., BARBOSA, M. L., SANTOS, L. F., JAKABI, M. E FRANCO, B. D. G. M. Assessment of Consumer Exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 8, p. 1-7, 2017.

SANTOS, E.C.C.; CASTRO, V.S.; CUNHA-NETO, A.; SANTOS, L.F.D.; VALLIM, D.C.; LISBÔA, R.C.; CARVALHO, R.C.T.; JUNIOR, C.A.C.; FIGUEIREDO, E.E.S. *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on carcasses and beef from a slaughterhouse located in Mato Grosso, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 15, p. 653-659, 2018.

SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., JONES, J. L., GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SCHEUTZ, F., TEEL, L., BEUTIN, L., PIERARD, D., BUVENS, G., KARCH, H., MELLMANN, A., CAPRIOLI, A., TOZZOLI, R., MORABITO, S., STROCKBINE, N., Melton-Celsa, A., SANCHEZ, M., PERSSON, S. e O'BRIEN, A. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, 50(9), p. 2951-2963, 2012.

SCHMIDT, H., BEUTIN, L. e KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1055–1061, Mar, 1995.

SCOTT, M. E., MBANDI, E., BUCHANAN, S., ABDELMAJID, N., GONZALEZ-RIVERA, C., HALE, K. R., JACOBSEN, L., WEBB, J., GREEN, J. AND DOLAN, P. *Salmonella* and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Products Sampled in the Food Safety and Inspection Service Raw Pork Baseline Study. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 3, p. 552-559, 2020.

SERRANO, N. S., ZWEIFEL, C., CORTI, S. AND STEPHAN, R. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 2, 2018.

SEVERI, E., VIAL, F., PERON, E., MARDH, O., NISKANEN, T. E TAKKINEN, J. Community-wide outbreaks of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in Italy and Romania: a new challenge for the European Union. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 49, 2016.

SIDHU, J. P. S., AHMED, W., HODGERS, L. AND TOZE, S. Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes in *Escherichia coli* Isolates from Surface Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 328-335, 2013.

STROMBERG, Z. R., REDWEIK, G. A. J. AND MELLATA, M. Detection, Prevalence, and Pathogenicity of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Cattle Hides and Carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 3, p. 119-131, 2018.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.0. São Paulo, 2019. [Acesso em: 9 de março de 2020]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

TAHA, Z. M. AND YASSIN, N. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in animal products in Duhok province, Iraq. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 4, p. 255-262, 2019.

TANABE, R. H. S., VIEIRA, M. A., MARIANO, N. A. B., DIAS, R. C. B., DA SILVA, R. V., CASTRO, C. M., DOS SANTOS, L. F., CAMARGO, C. H., YAMATOOGI, R. S., RALL, V. L. M. E HERNANDES, R. T. Identification and characterization of atypical enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef and poultry breast purchased in Botucatu, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1099-1103, 2019.

TRABULSI, L. R., KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TORO, M., RIVERA, D., JIMÉNEZ, M. F., DÍAZ, L., NAVARRETE, P. E REYES-JARA, A. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. **Food Microbiology**, v. 75, p. 55-60, 2018.

TROTZ-WILLIAMS, L. A., MERCER, N. J., WALTERS, J. M., MAKI, A. M. E 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. e322-e326, 2012.

USDA. Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges. In:(Ed.). **Laboratory Guidebook**, 2017.

USDA. **Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (Non-O157 STEC)**. v.1, 2012.

UYTTENDAELE, M. R., DEBEVERE, J. M., LIPS, R. M. e NEYTS, K. D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 1-8, 1998.

VARCASIA, B., TOMASSETTI, F., DE SANTIS, L., DI GIAMBERARDINO, F., LOVARI, S., BILEI, S. E DE SANTIS, P. Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Beef Marketed in 13 Regions of ITALY (2017). **Microorganisms**, v. 6, n. 4, p. 126, 2018.

VAZ, T. M. I., IRINO, K., NISHIMURA, L. S., CERGOLE-NOVELLA, M. C. E GUTH, B. E. C. Genetic Heterogeneity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 798-804, 2006.

VENEGAS-VARGAS, C., HENDERSON, S., KHARE, A., MOSCI, R. E., LEHNERT, J. D., SINGH, P., QUELLETTE, L. M., NORBY, B., FUNK, J. A., RUST, S., BARTLETT, P. C., GROOMS, D., e MANNING, S. D. Factors associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology** v. 82, p. 5049-5056, 2016.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VON-LAER, A. E.; DE SOUZA, K. L. O.; SAKATE, R.; MOSCARDI-JUNIOR, E.; PINTO, J. P. A. N.; IRINO, K.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Virulence GeneS and Enterohemolysin Production by *Escherichia coli* Isolates Derived from Feedlot Beef Cattle, Environmental and Carcasses. **94TH Annual Meeting International Association Food Protection**, Lake Buena Vista, Florida, EUA, 2007.

WASILENKO, J., FRATAMICO, P., SOMMERS, C., DEMARCO, D., VARKEY, S., RHODEN, K. and TICE, G. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and *Salmonella* in retail raw ground beef using the DuPont BAX® system. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, Jun, 2014.

WHITTAKER, P. J., SOPWITH, W., QUIGLEY, C., GILLESPIE, I., WILLSHAW, G. A., LYCETT, C., SURMAN-LEE, S., BAXTER, D., ADAK, G. K. AND SYED, Q. A national outbreak of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with consumption of lemon-and-coriander chicken wraps from a supermarket chain. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 375-382, 2009.

WILSON, D., DOLAN, G., AIRD, H., SORRELL, S., DALLMAN, T. J., JENKINS, C., ROBERTSON, L. E GORTON, R. Farm-to-fork investigation of an outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 3, 2018.

WU, Y., HINENOYA, A., TAGUCHI, T., NAGITA, A., SHIMA, K., TSUKAMOTO, T., SUGIMOTO, N., ASAKURA, M. e YAMASAKI, S. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, p. 589-597, 2010.

YANG, S., LIN, C., ALJUFFALI, I. A. E FANG, J. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 6, p. 811-825, 2017.

YOUNIS, G. A., ELKENANY, R. M., FOUUDA, M. A. E MOSTAFA, N. F. Virulence and extended-spectrum β -lactamase encoding genes in *Escherichia coli* recovered from chicken meat intended for hospitalized human consumption. **Veterinary World**, v. 10, n. 10, p. 1281-1285, 2017.

ZHANG, W, BIELASZEWSKA, M, KUCZIUS, T, KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 1441-1446, 2009.

ZHANG, S., YANG, G., HUANG, Y., ZHANG, J., CUI, L. AND WU, Q. Prevalence and Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Retail Foods in China. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 11, p. 1761-1767, 2018.