



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANTONIO ROBERTO ELIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICA EM
CARNE BOVINA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2017

ANTONIO ROBERTO ELIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICA EM
CARNE BOVINA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2017

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

Elias Junior, Antonio Roberto.

DETECÇÃO DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA EM CARNE BOVINA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL / Antonio Roberto Elias Junior. - Londrina, 2017.
35 f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Escherichia coli - Tese. 2. Carne Moída - Tese. 3. Diarreia - Tese. 4. Sorotipagem - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ANTONIO ROBERTO ELIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICA EM CARNE
BOVINA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Tereza C. R. Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sérgio P. Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 06 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades e conquistas.

Aos meus pais, Antonio Roberto Elias e Gisele Cordeiro, por sempre apoiar, ajudar e incentivar em minhas decisões, por sempre permanecer ao meu lado e, sempre acreditando em meu potencial.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo, pelos ensinamentos, pelo ótimo acolhimento e paciência com um aluno iniciante de uma especialização à conquista de um mestrado.

Ao meu irmão, Cassius Marcelus Elias, por todo o apoio e pela ajuda.

Ao Prof. Dr. Sérgio P. Dejato da Rocha, por estar presente durante todo o decorrer do trabalho, pelos ensinamentos e por acompanhar minha evolução durante esses anos.

À Prof^a Dr^a Renata Katsuko T. Kobayashi, por participação em banca, pelo aprendizado, pelas correções e pelos elogios.

À Prof^a Dr^a Rosa Elisa Carvalho Linhares, por participação em banca, pela atenção com meu trabalho nesse momento e pelos ensinamentos.

À Prof^a Dr^a Tereza C. R. Moreira de Oliveira, por participar da etapa final desta conquista, com suas dicas e ensinamentos.

Ao aluno – mestre e doutorando – Paulo Alfonso Schuroff, por ajudar em tudo que precisei e, sempre me incentivando.

Aos amigos do laboratório: Carol, Kawana, Gustavo, Anahí, Jeanne, Angélica e Claci, pela amizade, ajuda e momentos alegres.

Aos meus grandes amigos: Logan, Renan, Bruna, João e Bianca, por todos os momentos passados juntos, pela amizade e pelos ótimos sorrisos gerados.

À duas grandes amigas: Natalia e Jacqueline, pela amizade e pelo auxílio nos momentos difíceis, sempre proporcionando ótimos sorrisos no final.

Muito Obrigado!

“O elogio que vem daquele que merece o elogio
está acima de todas as recompensas”

J. R. R. Tolkien

Elias Junior, A. R. **Detecção de *Escherichia coli* diarreiogênica em carne bovina na região norte do estado do Paraná, Brasil.** 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2017.

RESUMO

A carne moída bovina é muito consumida pela população e se constitui em um excelente meio para a multiplicação de microrganismos pelos nutrientes e pela manipulação que passa até o consumo, podendo conter microrganismos patogênicos, como o grupo da *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC). O trabalho teve por objetivo verificar a presença de patótipos de DEC, em amostras de carne moída bovina comercializadas na cidade de Londrina – PR, no período de 2014 – 2015, utilizando a técnica da PCR para pesquisa dos genes de virulência, padrão de adesão em células HEp-2, sorotipagem, teste de sensibilidade a antimicrobianos e filogenia. Dos 400 isolados de *E. coli*, cinco (5%) foram caracterizadas como *E. coli* enteroagregativa, três (3%) como *E. coli* produtora de toxina Shiga e duas (2%) como *E. coli* enteropatogênica. De acordo com a filogenia, dos dez isolados de DEC, cinco amostras (50%) pertencem ao grupo A, duas (20%) ao grupo E, duas (20%) ao grupo B1 e uma (10%) não foi classificada em nenhum dos sete filogrupos. Os sorótipos encontrados foram: O152:H8, O93:H46, O175:H7, O105ab:H7, O156:H10, O93:H9 e O3:H2. Em relação aos antimicrobianos, uma amostra (10%) foi resistente à ampicilina, duas (20%) à sulfametoxazol-trimetoprim e uma (10%) a cefalotina. Conclui-se assim, que a carne moída bovina pode ser um reservatório de DEC para o homem enfatizando-se a importância da higiene adequada, desde o preparo da carne até sua exposição à mesa.

Palavras-Chave: *Escherichia coli* diarreiogênica. Carne moída bovina. Gastreenterite. Sorotipagem

Elias Junior, A. R. **Detection of Diarrheagenic *Escherichia Coli* in Bovine Meat in the Northern Region of Paraná State, Brazil.** 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2017.

ABSTRACT

Ground bovine meat is commonly consumed by the population of Brazil. However, it constitutes an excellent medium for the multiplication of microorganisms due to available nutrients and handling practices prior to consumption. Here, we examined 100 samples of ground beef for the presence of diarrheagenic Escherichia coli (DEC) pathotypes by PCR, and characterized isolates by analyzing their adherence to HEp-2 cells, serotype, antimicrobial susceptibility, and phylogeny. Enteroaggregative E. coli was detected in five (5%) meat samples, Shiga toxin-producing E. coli in three (3%), and atypical enteropathogenic E. coli in two (2%). According to the phylogeny, six isolates (60%) were classified in group A, two (20%) in group B1, and two (20%) in group E. The detected serotypes were O3:H2, O93:H9, O93:H46, O105ab:H7, O152:H8, O156:H10, and O175:H7. The antimicrobial susceptibility testing showed that one sample (10%) was resistant to ampicillin, two (20%) to sulfamethoxazole-trimethoprim, and two (20%) to cephalothin. Based on these results, bovine ground meat for human consumption can serve as a reservoir of DEC, which emphasizes the importance of appropriate hygienic-sanitary conditions during handling at every stage from slaughter to table.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Ground beef. Gastroenteritis. Serotyping.

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Primer sequence and size of products obtained used for the genes research.....	33
Table 2 - Genotypic and phenotypic characteristics of DEC isolated from bovine ground meat.....	35

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)	11
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)	12
2.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	14
2.4	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)	16
2.5	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROINVASORA (EIEC)	17
2.6	RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS	17
2.7	SOROTIPAGEM	18
2.8	FILOGENIA	18
3.	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4.	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	27

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne do mundo, se destacando como exportador mundial de carne bovina. Além disso, cerca de 80% da produção é destinada ao mercado interno, mostrando então um alto índice do consumo de carne bovina no Brasil.

A carne faz parte de uma alimentação saudável, pois é rica em proteínas, vitaminas do complexo B, ácidos graxos essenciais e minerais como ferro, zinco e fósforo. Entretanto, também é um excelente meio para proliferação de microrganismos.

A carne moída é consumida pela maioria da população e, também, passa por diversas manipulações, sendo usada no preparo de diversos pratos, além de outros alimentos como, por exemplo, salgados e sanduíches. Devido a manipulação, a carne moída pode ser responsável pela veiculação de bactérias patogênicas para o homem, tais como: *Salmonella* sp; *Campylobacter* sp; e *Escherichia coli*, sendo este um indicador de contaminação fecal.

Apesar de *E. coli* fazer parte da microbiota intestinal humana e proporcionar benefícios para seus hospedeiros, algumas cepas dessa espécie podem causar danos à saúde e são conhecidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC), divididas em oito patotipos.

Com o alto consumo de carne bovina no Brasil, também aumentam os riscos de contaminação em humanos com cepas patogênicas de DEC. Assim, são necessários estudos que evidenciem a distribuição e frequência dos patotipos de DEC e, além disso, visar a importância de reforçar a necessidade de promoção de programas que disseminem as boas práticas de higiene no preparo de carne moída nos açougues, supermercados e pela população em geral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil tem o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo, alcançando cerca de 200 milhões de cabeças. A extensão territorial e o clima tropical do Brasil contribuem para esse resultado, já que permitem a criação da maioria do gado em pastagens (MAPA, 2015).

Carne moída é um alimento muito consumido no Brasil, devido a sua aceitabilidade e por ser acessível a toda população, incluso a de menor poder aquisitivo (MOTTA; BELMONTE; PANETTA, 2000). Os alimentos cárneos, particularmente aqueles que passam por intenso manuseio, como é o caso da carne moída, se constituem de excelente meio de cultura devido a sua composição rica em nutrientes, favorecendo assim a contaminação e multiplicação de uma diversidade de microrganismos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Reconhecida como um patógeno de origem alimentar (JAY, 2005), *Escherichia coli* é um bastonete gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado, da família Enterobacteriaceae que faz parte da microbiota normal do intestino do homem e animais de sangue quente. Por se tratar de uma bactéria de origem intestinal, sua presença no alimento reflete contaminação fecal, o que remete a falhas nas condições higiênico-sanitárias (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

E. coli associadas a infecções intestinais, conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) são agrupadas em oito patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012). EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) passou a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A carne e os produtos cárneos têm sido implicados em surtos de doenças causadas por DEC em vários países (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANI, 2009; LEITE JUNIOR; OLIVEIRA; SILVA, 2014).

2.1 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patotipo de DEC identificado. Foi descrito em 1945 durante um surto de diarreia infantil no Reino Unido (BRAY, 1945). Porém, seu potencial patogênico só foi confirmado e aceito anos depois, após estudos com voluntários que ingeriram o microrganismo e apresentaram sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

Kaper (1996) propôs a subdivisão de EPEC em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). tEPEC compreende as bactérias que apresentam o plasmídeo *EAF* (*EPEC adherence factor*) e o gene *eae* (*E. coli attaching and effacing*), enquanto aEPEC apresenta o gene *eae*, não apresenta o plasmídeo *EAF* e difere de EHEC por não produzir a toxina Shiga (Stx).

Um dos principais fatores de virulência de EPEC é a propriedade de aderir intimamente ao epitélio da mucosa intestinal causando uma lesão histopatológica conhecida como lesão A/E (*attaching-effacing*), (MOON et al., 1983; KNUTTON et al., 1989). Essa adesão íntima da bactéria aos enterócitos promove a destruição das microvilosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e ao rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, sobre o qual a bactéria encontra-se aderida (MOON et al., 1983). A formação da lesão A/E requer a expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal de 35 kb, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (McDANIEL et al., 1995). A região LEE possui os genes *eae* e *tir* (*translocated intimin receptor*), os quais codificam, respectivamente, uma proteína de membrana externa denominada intimina (JERSE et al., 1990) e seu receptor Tir, que é translocado para a célula epitelial (KENNY et al., 1997).

O plasmídeo *EAF* (*EPEC adherence factor*) alberga os genes envolvidos na montagem e expressão da adesina fimbrial, BFP, envolvida na patogênese de tEPEC, que permite a aderência bacteriana e possibilita a adesão às células epiteliais (GIRÓN et al., 1993). Quando em contato com células epiteliais em cultura, amostras de tEPEC apresentam um padrão característico de adesão denominado adesão localizada (AL), no qual as bactérias estão aderidas em grupos compactos,

em um ou mais pontos na superfície da célula epitelial (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984).

Este fenótipo é decorrente da expressão da fimbria BFP, ausente em aEPEC. Por essa razão, amostras de aEPEC expressam frequentemente o padrão de adesão localizada-like (AL-L), onde as bactérias aderem em grupos bastante esparsos, em um ou mais pontos da superfície da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 1996).

Por muitos anos, as tEPEC foram responsáveis pela diarreia aguda em crianças principalmente no primeiro ano de vida, nos países em desenvolvimento. Desde a década de 60, aEPEC tem aumentado sua incidência em relação as tEPEC, sendo que, nos países desenvolvidos e em países em desenvolvimento, vem aparecendo como um patógeno emergente (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; BUERIS et al., 2007; DIAS et al., 2016). EPEC ainda continua sendo uma das principais causas de diarreia infantil nos países em desenvolvimento (OCHOA; CONTRERAS, 2011; DIAS et al., 2016).

Estrada-Garcia et al. (2009), no México, coletaram 795 amostras de fezes de crianças com diarreia, encontrando 117 isolados de DEC, sendo aEPEC as mais encontradas, seguido de ETEC e tEPEC, no qual a prevalência para aEPEC foi de 44,5% (52/117) e de 10% (12/117) para tEPEC.

2.2 *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)

STEC é um importante enteropatógeno em todo o mundo, podendo causar diarreia aguda, sanguinolenta e complicações de grande importância clínica, como a colite hemorrágica (CH) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). Podem expressar um ou ambos os tipos de toxina Shiga, designadas de Stx1 e Stx2, a última intimamente relacionada à SHU (HUNT, 2010; CLEMENTS et al., 2012).

Os ruminantes, principalmente os bovinos e ovinos, são seus principais reservatórios. Entretanto, foi encontrado STEC em outros animais como cães e gatos. Sendo assim, a contaminação fecal dos alimentos representa uma das principais fontes de infecção para humanos e a transmissão pessoa-pessoa também tem sido observada em surtos, visto que a dose infecciosa é aparentemente baixa (PATON e PATON, 1998a; PUÑO-SARMIENTO et al, 2014; MARTINS et al. 2015).

EHEC, uma subcategoria de STEC, foi descrita na década de 1980 quando isolaram a primeira EHEC do sorotipo O157:H7 em um surto de diarreia sanguinolenta associado à ingestão de carne de hambúrguer mal-cozida (RILEY et al., 1983). Além do gene *stx*, EHEC também contém o gene *eae*, semelhante ao de EPEC, sendo capazes de causar a lesão A/E (CROXEN; FINLAY, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

A partir do primeiro isolamento de EHEC O157:H7, mais de 100 surtos foram descritos, com 50% sendo atribuídos ou relacionados a alimentos derivados da carne (WOERNER et al., 2006; PERESI et al., 2016). Ainda que o sorogrupo O157 seja atualmente o mais estudado, existem mais de 100 sorogrupos de STEC implicados em doenças humanas, com destaque para os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 que estão sendo cada vez mais isolados de surtos e casos clínicos (PERELLE et al., 2007, KUEHNE et al., 2016).

EHEC é um dos principais problemas de saúde pública em vários países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Canadá e Japão, além de vários países da Europa, e há vários relatos de casos na América Latina (KAPER; O'BRIEN, 1998; BEUTIN et al., 2006; LASCOWSKI et al. 2013). Roldán et al. (2007), na Argentina, detectaram EHEC O157:H7 em 1,2% (3/250) dos produtos cárneos analisados.

O panorama entre 1982 e 2002 mostrava que a maioria dos surtos por STEC era relacionado a carnes, leites não pasteurizados e derivados contaminados com o sorotipo O157:H7 (RANGEL et al. 2005). Atualmente, STEC estão envolvidas em surtos envolvendo alimentos não cárneos, como alface e espinafre (FENG et al., 2011) e, também, ocorrem surtos causados por cepas não-O157. Scallan et al. (2011), demonstraram que sorogrupos não-O157 estão atualmente mais envolvidos com surtos relacionados a alimentos nos EUA do que o próprio sorogrupo O157. Tal fato pode ter relação com o crescente estudo e desenvolvimento de metodologias capazes de identificar sorogrupos não-O157. Por outro lado, o índice de hospitalizações e mortes permanece maior para o sorogrupo O157 (SCALLAN et al., 2011).

De acordo com Gerber et al. (2002), mais de 83% dos casos de SHU em crianças ocorrem após infecções por STEC. Na Argentina, SHU é endêmico e anualmente são notificados aproximadamente 400 novos casos em unidades de nefrologia de hospitais do país e, 95% dos casos de SHU acometem crianças

menores de cinco anos de idade (SIGNORINI; TARABLA, 2010). Oliveira et al. (2008), em Minas Gerais – Brasil, estudando amostras fecais, encontraram 39,2% (40/102) STEC em gado de corte e 57% (61/106) STEC em amostras de cabra, *stx2* foi encontrado em 30% dos isolados de gado e em 34,7% das amostras de cabra, enquanto constataram *stx1* mais *stx2* em 54,4% das amostras de gado e em 41,2% das de cabra. Farah et al. (2007), no estado do Paraná – Brasil, encontraram 64 casos de STEC em 107 amostras fecais de gado, das quais, 62 amostras apresentaram o gene *stx2*.

Xiangning et al. (2015), na China, coletaram 853 amostras de carne de duas regiões distintas do país, onde encontraram 31 (3,6%) amostras positivas para o gene *stx1*, 58 (6,8%) amostras positivas para o gene *stx2* e 77 (9%) amostras positivas para ambos os genes, verificando a prevalência de STEC.

Samadpour et al. (2002), no condado de King, Washington, Estados Unidos, obtiveram 16,8% (50/296) de positividade para STEC de amostras de carne moída.

2.3 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

EAEC é definida como o patótipo de DEC que expressa o padrão de adesão agregativa (AA) em células epiteliais, como HEp-2 e nestas, as bactérias formam agregados em uma configuração que lembra tijolos empilhados. Essa adesão ocorre na superfície das células e também na superfície da lamínula formando arranjos que lembram aos favos de uma colmeia (NATARO et al., 1987, NATARO; KAPER, 1998).

Um importante gene que participa da patogênese de EAEC é o *aggR*, um ativador transcricional que promove a expressão de fatores de virulência tanto plasmidiais quanto cromossomais (DUDLEY et al., 2006). Nataro e Kaper (1998), sugeriram o termo EAEC típica (tEAEC) para as cepas que apresentavam *aggR*, além do padrão AA e, para EAEC atípica (aEAEC) as que apresentavam o padrão AA, mas não o gene *aggR*.

Vários trabalhos têm descrito surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) causados por EAEC. Três surtos de DTAs foram relatados no Japão. O primeiro envolveu mais de 2500 alunos que comeram uma merenda escolar que foi identificada como a causa do surto (ITOH et al., 1997). O segundo e o terceiro

envolveram alunos de ensino médio e adultos em uma festa (YATSUYANAGI et al., 2002). Outros quatro surtos de DTAs foram descritos no Reino Unido, envolvendo restaurantes, jantares organizados para o Natal e em uma conferência (SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997).

EAEC está fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias (CRAVIOTO et al., 1991; LIMA et al., 1992), o que pode levar a uma desnutrição, problemas de crescimento e de desenvolvimento cognitivo (NAVARRO-GARCIA et al., 2010), associada também à diarreia do viajante (PASCHKE, et al., 2011) e está presente em surtos de diarreia associados pela ingestão de alimentos e água contaminados (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). Também têm sido isolados de fezes de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MEDINA, et al., 2010).

E. coli O104:H4, implicada em um surto associado ao consumo de alimento contaminado em 2011, no norte da Alemanha, causou o maior número de casos de SHU (852) e mortes (50) já registrado em um único surto de *E. coli* (BIELASZEWSKA et al., 2011). O sequenciamento do genoma desta amostra revelou que se tratava de uma EAEC que adquiriu genes do fago que codifica Stx2 (RASKO et al., 2011).

Sobre a patogênese de EAEC, diversos estudos têm sugerido três estágios, sendo: (1) aderência na mucosa intestinal e na camada de muco; (2) formação de biofilme e aumento da produção de muco pelos enterócitos, podendo promover uma colonização persistente e má absorção de nutrientes; (3) secreção de toxinas e outras proteínas de virulência levando à indução de resposta inflamatória (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

2.4 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

ETEC é o agente etiológico mais frequente da diarreia do viajante e de diarreia aguda em crianças e adultos em zonas endêmicas. Causa diarreia aquosa que pode variar de uma doença leve a grave (QADRI et al., 2005; ISIDEAN et al., 2011). A patogenicidade de ETEC se dá pela produção das enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). Os genes *est* e *elt* são encontrados em plasmídeos e codificam as toxinas ST e LT, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998).

O desenvolvimento da diarreia ocorre através da adesão, colonização do intestino delgado e produção de enterotoxinas (HADAD; GYLES, 1982). As enterotoxinas causam perda de água e eletrólitos, provocando diarreia e desidratação. Tal adesão é mediada por adesinas, denominadas fatores de colonização, presentes na superfície bacteriana e que reconhecem receptores específicos na superfície da célula epitelial intestinal (GAASTRA; GRAAF, 1982).

Diarreia por ETEC se dá pela ingestão de alimentos e água contaminados (NATARO; KAPER, 1998). Em uma situação onde água e condições sanitárias são inadequadas, ETEC é uma das maiores causas de doença diarreica (QADRI et al., 2005).

Estudo realizado em Porto Velho, com 470 crianças de até 72 meses de idade, acometidas de diarreia, encontrou-se DEC em 86 crianças, ou seja, 18,2% dos casos, sendo 21 (4,4%) casos ocorridos por ETEC (ORLANDI et al., 2006). Estudo realizado ao sul da Tailândia, de 150 amostras de carnes cruas (frango, porco e bovino) foi encontrado ETEC em 42% (27/64) das amostras de frango, sendo sete amostras positivas para o gene *est* e vinte para o gene *elt*, ETEC em 25% (9/36) das amostras de porco, encontrando o gene *est* em quatro das amostras e *elt* nas outras cinco e, quanto às amostras de carne bovina, ETEC foi encontrado em 12% (6/50), as quais apresentaram somente o gene *elt*. Visando assim, que tais carnes cruas, podem vir a ser uma potencial fonte para este patotipo de DEC (PHETKHAJORN et al., 2014).

2.5 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASORA (EIEC)

EIEC, de acordo com as características genética, bioquímica e de patogenicidade, se assemelha à *Shigella* spp. (NATARO; KAPER, 1998; LAN et al., 2004). Pode causar colite inflamatória invasiva e, ocasionalmente, disenteria, mas na maioria dos casos causa diarreia aquosa. Seu mecanismo de patogenicidade consiste de cinco etapas: penetração na célula epitelial, lise do vacúolo endocíticos, multiplicação bacteriana, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Os genes necessários para a patogenicidade de EIEC estão albergados em um plasmídeo de virulência (JOHNSON; NOLAN, 2009). Este plasmídeo codifica um sistema de secreção do tipo III que resulta múltiplos efeitos de patogenicidade de

EIEC e de *Shigella*, secretando uma variedade de proteínas, entre elas: IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, que medeiam eventos como sinalização das células epiteliais, o rearranjo do citoesqueleto, a lise de vacúolos endocíticos, entre outras ações (CLEMENTS et al., 2012).

Este patotipo é pouco isolado. Estudos no Brasil descreveram a presença de EIEC em 1,4% dos isolados de amostras de fezes em Porto Velho e João Pessoa (ORLANDI et al., 2006; MORENO et al., 2010). Em 2014, surto envolvendo EIEC foi reportado em dois restaurantes da Europa, onde descobriram alfaces como sendo o veículo transmissor do patógeno (NEWITT et al., 2016).

2.6 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Uma característica importante que vem sendo descrita em *E. coli* é a resistência a múltiplos antibióticos em isolados de origens diversas (ERB et al., 2007; REBELLO; REGUA-MANGIA, 2014). Antibióticos frequentemente utilizados ao longo dos anos contribuíram para a alta taxa de resistência em *E. coli*, como por exemplo, o aumento na resistência a ampicilina e trimetoprim (KRONVALL, 2010). Em Osaka - Japão, de 333 amostras de alimentos (carne, frutas e verduras), 82 apresentavam DEC. A resistência antimicrobiana à tetraciclina foi mais comum (49%), seguida de ácido nalidíxico (28%), ampicilina (24%), sulfametoxazol/trimetoprim (20%) e cefalotina (18%). Das cepas resistentes, 44% (22/50) demonstraram resistência a mais de 3 agentes antimicrobianos (WANG et al., 2017).

2.7 SOROTIPAGEM

E. coli apresenta antígenos de superfície que possibilitam a classificação em sorogrupos (antígeno somático ou O) e sorotipos (antígeno somático e flagelar ou H) (EWING, 1986). Através de estudos sorológicos empregando reações de aglutinação com antissoros específicos, já foram identificados mais de 180 antígenos O. Em adição, também foram descritos, pelo menos 60 antígenos H e 100 antígenos K (antígeno capsular) diferentes, possibilitando inúmeras combinações (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004). A sorotipagem de DEC é importante em

estudos epidemiológicos, evidenciando uma grande diversidade de sorotipos (NATARO; KAPER, 1998).

2.8 FILOGENIA

De acordo com a técnica filogenética descrita por Clermont et al. (2013), as cepas de *E. coli* são classificadas em sete principais grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E e F. A filogenia tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de agrupar cepas de *E. coli* patogênicas. Cepas pertencentes aos grupos A e B1 estão associadas com patógenos intestinais (GORDON et al., 2008), porém, algumas também são encontrados em outros grupos, como os grupos D e E (BINGEN et al., 1998; PUPO et al., 1997).

3. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEUTIN, L. et al. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. **Journal of Applied Microbiology**. v. 102, p. 630-639, 2006.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 11, p. 671-676, 2011.

BINGEN, E. et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strain. **Journal of Infectious Diseases**. v. 177, p. 642-650, 1998.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 57, p. 239-247, 1945.

BUERIS, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 839-844, 2007.

CANIZALEZ-ROMAN, A. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. **International Journal of Food Microbiology**. v. 164, p. 36–45, 2013.

CAMPOS L.C., FRANZOLIN M.R., TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 545-552, 2004.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**. v. 3, p.71-87, 2012.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**. v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CRAVIOTO, A. et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **The Lancet**. v. 337, p. 262-264, 1991.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 26-38, 2010.

DIAS, R. C. B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Acta Pathologica, Microbiologia et Immunologica Scandinavica**. v. 124, p. 299-308, 2016.

DUDLEY, E. G., THOMSON, N. R., PARKHILL, J., MORIN, N. P., NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. v. 61, p. 1267-1282, 2006.

ERB, A.; STÜRMER T.; MARRE R.; BRENNER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 26, p. 83-90, 2007.

ESTRADA-GARCIA, T. et al. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 93–98, 2009.

ESTRADA-GARCIA, T., NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 66, p. 281-298, 2012.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Publishing Company. p. 536, 1986.

FARAH, S.M.S.S. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 44, p. 606–612, 2007.

FENG, P. C. H. et al. Virulence characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from wholesale product. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, p. 343-345, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

GAASTRA, W.; DE GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiological Reviews**. Washington, v. 46, p. 129-161, 1982.

GERBER, A. et al. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. **Journal of Infectious Diseases**. v. 186, p. 493-500, 2002.

GIRÓN, J. A. et al. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**. v. 168, p. 1037-1041, 1993.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental microbiology**. v. 10, p. 2484–2496, 2008

HADAD, J. J.; GYLES, C. L. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrums-fed calves infected with selected strains of *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 43, p. 41-49, 1982.

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

HUNT, J. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 30, p. 21-45, 2010.

ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**. v. 29, p. 6167-6178, 2011.

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p. 2546–2550, 1997.

JAY, J. M. trad. TONDO, E. C. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JERSE A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary to produce attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 87, p. 7839-7843, 1990.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 73, p. 750-774, 2009.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**. v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Washington. ASM Press**. p. 465, 1998.

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

KUEHNE, A. et al. Estimating true incidence of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* illness in Germany based on notification data of haemolytic uraemic syndrome. **Epidemiology and Infection**. v. 144, p. 3305–3315, 2016.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**. v. 91, p. 511-520, 1997.

KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KRONVALL, G. Antimicrobial resistance 1979–2009 at Karolinska Hospital, Sweden: normalized resistance interpretation during a 30-year follow-up on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistance development. **Acta Pathologica, Microbiologia et Immunologica Scandinavica**. v. 118, p. 621-639, 2010.

LAN, R. et al. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**. v. 72, p. 5080-5088, 2004.

LASCOWSKI, K. M. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of North Paraná State, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v. 114, p. 1230-1239, 2013.

LEITE JUNIOR, B. R. C., OLIVEIRA, P. M., SILVA, F. J. M. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine feces, feed, water, raw milk, pasteurized milk, Minas Frescal cheese and ground beef samples collected in Minas Gerais, Brazil. **International Food Research**. v. 21, p. 2481–2486, 2014.

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **The Lancet**. v. 1, p. 1119-1122, 1978.

LIMA, A. A. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica Supplement**. v. 381, p. 37-44, 1992.

MEDINA, A. M. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 83, p.158-163, 2010.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 66, p. 50-57, 2010.

MARTINS, F. H. et al. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 175, p. 150–156, 2015.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Bovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em 07 de Outubro de 2015.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.) **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Oak, Park: Bentham Science Publishers, cap. 4, p. 48-64, 2010.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines **Infection and Immunity**. v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A.; PANETTA, J. C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 14, p. 59-62, 2000.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 16. p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, p. 142-201, 1998.

NEWITT, S. et al. Two linked enteroinvasive *Escherichia coli* outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. **Emerging Infectious Diseases** v. 22, p. 1178 – 1184, 2016.

NGUYEN, Y. SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 2, p. 1-7, 2012.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 24, p. 478-483, 2011.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v.127, p. 139-146, 2008.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 507-517, 2006.

PASCHKE, C. et al. Controlled study on enteropathogens in travelers returning from the tropics with and without diarrhea. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, p. 1194-1200, 2011.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, p. 450-479, 1998.

PERELLE, S. et al. Screening food raw material for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 284-288, 2007.

PERESI, J. T. M. et al. 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

PHETKHAJORN, S. et al. Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction-Based Quantification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Raw Meats in Southern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 45, p. 1385-1391, 2014.

PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains avian organic fertilizers. **International Journal Environmental Research and Public Health**. v. 11, p. 8924-8939, 2014.

PUPPO, G. M. et al. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. **Infection and Immunity**. v. 65, p. 2685-2692, 1997.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, p. 465-483, 2005.

RANGEL, J. M. et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, p. 603-609, 2005.

RASKO, D. et al. Origins of the *Escherichia coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **New England Journal of Medicine**. v. 365, p. 709-717, 2011.

REBELLO, R. C.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**. v. 490, p. 19-27, 2014.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANI K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**. v. 26, p. 357-376, 2009.

RILEY, L. W. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**. v. 308, p. 681-685, 1983.

RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strain of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**. v.64, p. 2680-2686, 1996.

ROLDÁN, M. L. et al. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 39, p. 113-119, 2007.

SAMADPOUR, M. et al. Prevalence of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington. **Journal of Food Protection**. v. 65, p. 1322-1325, 2002.

SCALETISKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**. v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**. v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SIGNORINI, M. L.; TARABLA, H. D. Interventions to reduce verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef in Argentina: A simulation study. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 94, p. 36-42, 2010.

SMITH, H. R., CHEASTY, T., ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **The Lancet**. v. 350, p. 814–815, 1997.

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.

XIANGNING, B. et al. 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.

YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 294–297, 2002.

WOERNER, et al. Determining the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 2824-2827, 2006.

WANG, L. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 249, p. 44-52, 2017.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de DEC em cepas isoladas de amostras de carne moída comercializadas em Londrina, PR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar genes associados a fatores de virulência em DEC, através da técnica da PCR;
- Caracterizar o padrão de adesão em células HEp-2;
- Determinar a sorotipagem;
- Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico;
- Realizar a Filogenia.

5. TRABALHO CIENTÍFICO

*Artigo submetido à revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

Detection of Diarrheagenic *Escherichia Coli* in Bovine Meat in the Northern Region of Paraná State, Brazil

DEC in Bovine Meat

ABSTRACT

Ground bovine meat is commonly consumed by the population of Brazil. However, it constitutes an excellent medium for the multiplication of microorganisms due to available nutrients and handling practices prior to consumption. Here, we examined 100 samples of ground beef for the presence of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) pathotypes by PCR, and characterized isolates by analyzing their adherence to HEp-2 cells, serotype, antimicrobial susceptibility, and phylogeny. Enteroaggregative *E. coli* was detected in five (5%) meat samples, Shiga toxin-producing *E. coli* in three (3%), and atypical enteropathogenic *E. coli* in two (2%). According to the phylogeny, six isolates (60%) were classified in group A, two (20%) in group B1, and two (20%) in group E. The detected serotypes were O3:H2, O93:H9, O93:H46, O105ab:H7, O152:H8, O156:H10, and O175:H7. The antimicrobial susceptibility testing showed that one sample (10%) was resistant to ampicillin, two (20%) to sulfamethoxazole-trimethoprim, and two (20%) to cephalothin. Based on these results, bovine ground meat for human consumption can serve as a reservoir of DEC, which emphasizes the importance of appropriate hygienic-sanitary conditions during handling at every stage from slaughter to table.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*, ground beef, gastroenteritis, serotyping

INTRODUCTION

In terms of bovine meat production, Brazil stands out as the world's second largest producer and number one exporter. Large amounts of beef are consumed by Brazilians, as approximately 80% of the beef produced in Brazil is destined for the domestic market.¹

Beef is rich in nutrients and easily accessible as a foodstuff to the majority of the population. However, its handling during food preparation contributes to its potential for contamination by pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli*, and transmission of these pathogens to humans.²

Although *E. coli* is part of the normal human intestinal microbiota, and these resident strains provide health benefits to the host, other strains of this species are pathogenic and can cause health problems, such as extra intestinal infections, caused by extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), and gastroenteritis, which is caused by diarrheagenic *E. coli* (DEC).³ There are eight known DEC pathotypes: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Shiga producing-toxin *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC), adherent invasive *E. coli* (AIEC) and enteroaggregative Shiga producing-toxin *E. coli* (STEAEC).⁴

EPEC is further subdivided into typical (tEPEC) and atypical (aEPEC); tEPEC contains the LEE region and an EPEC adherence factor (EAF) plasmid; aEPEC lacks the EAF plasmid and Shiga toxins (Stx1 and/or Stx2).⁵ For many decades, tEPEC was responsible for most cases of acute diarrhea occurring in children, especially during the first year of life. However, in recent years, the incidence of aEPEC has increased compared to that of tEPEC in both developed and developing countries.^{6,7}

STEC is an important foodborne enteropathogen, and ruminants, especially cattle and sheep, are its main reservoirs,^{8, 9} and STEC infection can lead to severe diseases, such as hemolytic uremic syndrome (HUS).

According to Gerber et al.,¹⁰ more than 83% of HUS cases in children occur following STEC infection. In Argentina, HUS is endemic, and approximately 400 new cases are reported annually in the nephrology units of hospitals in this country.¹¹

EAEC is strongly associated with persistent diarrhea, which can lead to malnutrition, growth problems, and cognitive development. This pathotype is also associated with traveler's diarrhea and outbreaks of diarrhea associated with the ingestion of contaminated food and water.^{12, 13, 14}

In this study, the virulence genes of DEC were investigated in *E. coli* isolates from samples of commercial bovine meat obtained in the city of Londrina, Brazil to assess the distribution and frequency of DEC.

MATERIAL AND METHODS

***Escherichia coli* Strains**

This study included 400 *E. coli* isolates from 100 samples of bovine meat. The bovine meat samples were collected from butcher shops and supermarkets in the city of Londrina, Paraná, Brazil from January to November 2014.

Several strains were obtained for use as positive controls in PCR and adhesion assays, including EPEC 2348/69 (O127:H6), EHEC EDL 933 (O157:H7), EAEC 042 (O44:H18), EIEC FBC124-13 (O124:H-), and ETEC H10407 (O78:K80:H11). *E. coli* K-12 strain (HB 101) was also used as a negative control.

Genotypic Characterization of DEC by PCR

All isolates were screened for the presence of virulence genes. Bacterial DNA was obtained by a boiling extraction method, and the supernatant was used in PCR performed on an Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler. All oligonucleotides used in this study are listed in Table 1.

The amplification reactions were performed in 25 µl reactions, containing 2 µl of bacterial lysate, 0.2 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 20 pmol of each oligonucleotide primer, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 1× reaction buffer, and ultrapure sterile water up to a final volume of 25 µl. The amplified products were separated by electrophoresis on a 1–2% agarose gel prepared in Tris-Borate EDTA (TBE) buffer. In each electrophoretic run, a molecular size marker (100 bp Ladder, Invitrogen™) was included to estimate the molecular size of the amplified fragments. The gels were stained with SYBER SAFE solution (Invitrogen™) and observed with ultraviolet light on a transilluminator (Vilbert Loumart™).

Adhesion, phylogeny, serotyping, and antimicrobial susceptibility assays were performed with all *E. coli* isolates that were positive for DEC virulence genes.

Adherence Assay in HEp-2 cells

Adherence to HEp-2 epithelial cells was assessed in a 6-hour bacterial-cell interaction assay according to the method described by Cravioto et al.²³

Phylogenetic Classification

The phylogenetic groups of the DEC isolates (A, B1, B2, C, D, E, and F) were determined by quadruplex PCR for four DNA markers (the genes *arpA*, *chuA*, and *yjaA* and the DNA fragment TSPE4.C2) as described by Clermont et al.²²

Serotyping

The O and H antigens were determined by Dr. Armando Navarro of the National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, using all available O (O1–O187) and H (H1–H56) antisera.

Antimicrobial Susceptibility Profile

Antimicrobial susceptibility was assessed by the Agar disk-diffusion method as described by Bauer et al., and according to guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute.^{24, 25}

RESULTS AND DISCUSSION

The prevalence of DEC isolates and their genotypic and phenotypic characteristics in 100 samples of beef are shown in Table 2.

Among the DEC isolates were two (2%) aEPEC, three (3%) STEC, and five (5%) EAEC. The tEPEC, EHEC, ETEC, and EIEC pathotypes were not isolated from the meat samples. In the HEp-2 cell-adhesion assay, EAEC strains exhibited aggregative adherence, aEPEC strains exhibited localized-like adherence, and the STEC strains exhibited an undefined adherence pattern (data not shown).

According to the serotyping, two EAEC isolates were serotype O93:H9 and three were O3:H2. Each of the three STEC isolates were different serotypes, i.e., O152:H8, O93:H46, and O175:H7, and the two aEPEC samples also were different serotypes (O105ab:H7 and O156:H10).

Serogroup O156, which was detected in one of our aEPEC isolates, is associated with both aEPEC and STEC strains; to our knowledge there have been no reports of aEPEC strain belonging to serotype O105ab:H7.²⁶

Several studies have shown that the number of tEPEC isolates from both food and fecal samples is increasing when compared to the number of aEPEC isolates. In Mexico, Estrada-Garcia et al. studied fecal samples from children, and obtained 117 (out of 795) DEC isolates; 44.5% (52/117) were aEPEC, and 10% (12/117) were tEPEC.²⁷ Mora et al. isolated EPEC strains from 94 stool samples from children with diarrheal disease in Quito, Ecuador, and they found that aEPEC was more prevalent (89.36%) than tEPEC (10.64%).⁷

In our study, STEC isolates only contained the *stx2* gene, which has variants that differ in their pathogenic potential. Studies have demonstrated a relationship between carriage of *stx2a*, *stx2c*, or *stx2d* and the development of both hemorrhagic colitis (HC) and HUS. In contrast, *stx2b* and *stx2e* showed little association with human diseases.^{28, 29} In the present study, an *stx2a* variant was found in one isolate, while the other two STEC isolates did not contain any of the tested *stx2* variants. In Brazil, Lascowski et al.³⁰ conducted a search for DEC isolates in samples of water for human consumption and isolated 12 strains of STEC; five of which contained *stx1* and *stx2*, two contained *stx1*, and five contained *stx2*. STEC O152:H8 has also been isolated from animal stool samples by other investigators. In Brazil, Farah et al.³¹ reported the presence of STEC serotype O152:H8 isolates containing *stx2* genes in bovine feces. In Bangladesh, Johura et al.³² analyzed 35 *E. coli* isolates from goats, sheep, cattle, chickens, and ducks found a STEC-ETEC hybrid strain belonging to serogroup O152:H8, indicating that such animals may be STEC reservoirs. Vernozy-Rozand et al.³³ detected STEC serogroup O175 in cheese samples, which also contained an *stx2* gene.

In our study, EAEC was isolated from 5 out of 100 (5%) meat samples. In Japan, three outbreaks of EAEC have been reported to be caused by contaminated foods. The first one involved approximately 2697 high school students who consumed school meals that were contaminated with an EAEC isolate of the ONT:H10 serotype.³⁴ The second and third outbreaks involved high school students and adults who attended a party where they were infected with EAEC strains belonging to the O126:NM and O111:NM serogroups.³⁵

In 2011, in northern Germany, *E. coli* was the causal agent of a major outbreak associated with the consumption of contaminated food, which was responsible for the largest number of HUS cases (852) and deaths (50) recorded in a single *E. coli* outbreak. Genome sequencing of this strain showed that it was an O104:H4 serotype EAEC strain that acquired genes from a phage encoding *stx2*.³⁶

An interesting finding in our study was the isolation of three EAEC strains belonging to the O3:H2 serotype, which was the same serotype as the 17-2 EAEC prototype sample.³⁷ The

O93 serogroup has been detected in STEC, Avium Pathogenic *E. coli* (APEC), and other DEC strains, thus showing the variety of serogroups and serotypes in the EAEC pathotype.³⁸ An important finding of our study is that both STEC and EAEC pathotypes of serogroup O93 were found.

According to the phylogenetic typing, the isolates were classified into three phylogenetic groups, A, B1, and E. Group A contained six (60%) isolates, three EAEC and three STEC; Group B1 contained two aEPEC isolates; and group E contained two EAEC pathotype isolates. These results are consistent with those reported by other researchers, such as Salmani et al.³⁹ who also showed a high prevalence of group A (35%), followed by group B1 (26%), in DEC isolates from feces.³⁹ In Osaka-Japan, Wang et al.⁴⁰ studied 333 food samples (meat, fruits, and vegetables) and detected DEC in 82 samples. In the phylogenetic typing, groups A and B1 were also predominant among these isolates.

Regarding antimicrobial resistance, one EAEC isolate (10%) was resistant to ampicillin, and two (20%) were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim. One STEC and aEPEC isolate each (10%) were resistant to cephalothin. These data are similar to those of other researchers. In a study of *E. coli* isolates from food, Canizalez-Roman et al.⁴¹ found that 29% were resistant to ampicillin and 14% were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim. Wang et al.⁴⁰ showed that among 82 DEC strains isolated from food, tetracycline resistance was most common (49%), followed by resistance to nalidixic acid (28%), ampicillin (24%), sulfamethoxazole/trimethoprim (20%), and cephalothin (18%). None of the DEC isolates showed resistance to more than one antimicrobial, and five (50%) were sensitive to all tested antimicrobials.

CONCLUSIONS

Based on our results, we can conclude that bovine ground beef, which is widely consumed by the population, can be contaminated by DEC pathotypes, such as aEPEC, STEC, and EAEC, which may present a health risk for the population.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Laboratory of Virology at the State University of Londrina for supplying HEp-2 cell cultures, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

REFERENCES

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Bovinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em 07 de Outubro de 2015.
2. Motta MRA, Belmonte MA, Panetta JC. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. *R Hig Aliment.* 2000;14:59-62.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev.* 2004;2:123-140.
4. Clements A, Young JC, Constantinou N, et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* 2012;3:71-87.
5. Kaper JB. Defining EPEC. *Rev Microbiol.* 1996;27:130-133.
6. Dias RC, Dos Santos BC, Dos Santos LF, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2016;124:299-308.
7. Mora FX, Avilés-Reyes RA, Guerrero-Latorre L, et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in children under five years old with diarrhea in Quito (Ecuador). *Int Microbiol.* 2016;19:157-160.
8. Martins FH, Guth BE, Piazza RM, et al. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. *Vet Microbiol.* 2015;175:150–156.

9. Shridhar PB, Siepker C, Noll LW et al. Shiga Toxin Subtypes of Non-O157 *Escherichia coli* Serogroups Isolated from Cattle Feces. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:1-6.
10. Gerber A, Karch H, Allerberger F, et al. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000. In: Germany and Austria: A prospective study. *J Infect Dis.* 2002;186:493-500.
11. Signorini ML, Tarabla HD. Interventions to reduce verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef in Argentina: A simulation study. *Prev Vet Med.* 2010;94:36-42.
12. Navarro-Garcia F, Elias WP, Flores J, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Oak, Park: Bentham Science Publishers. 2010;4: 48-64.
13. Paschke C, Apelt N, Fleischmann E, et al. Controlled study on enteropathogens in travelers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17: 1194-1200.
14. Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66:281-298.
15. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1375–1377.
16. Paton AW, Paton JC. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):598-602.
17. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3613–3619.
18. Zheng J, Cui S, Teel LD, et al. Identification and characterization of Shiga toxin type 2 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and humans. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(18):5645–5652.
19. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun.* 1995;63:1055–1061.
20. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis.* 2012; 205:431–444.
21. Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5849-5853.
22. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58–65.
23. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 1979;3:95-99.
24. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-496.
25. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twenty-Fourth Informational Supplement. NCCLS document M100-S24, Wayne, PA: National Committee of Clinical Laboratory Standards, 2014.
26. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, et al. Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. *Exp Biol Med.* 2003;228:345–351.
27. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, et al. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):p. 93–98.

28. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, et al. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999;37:497-503.
29. CA, Pellino CA, Flagler MJ, et al. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun.* 2011;79(3):1329 – 1337.
30. Lascowski KM, Guth BE, Martins FH, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of North Paraná State, Brazil. *J Appl Microbiol.* 2013;114:1230-1239.
31. Farah SMSS, de Souza EM, Pedrosa FO, et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2007;44:607-612.
32. Johura FT, Parveen R, Islam A, et al. Occurrence of Hybrid *Escherichia coli* Strains Carrying Shiga Toxin and Heat-Stable Toxin in Livestock of Bangladesh. *Front Public Health.* 2017;4:1-9.
33. Vernozy-Rozand C, Montet MP, Berardin M, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41:235-241.
34. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2546–2550.
35. Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, et al. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol.* 2002;40:294–297.
36. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *Escherichia coli* strain causing an outbreak of hemolytic—uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 2011;365:709-717.
37. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, et al. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis.* 1988;158:70-79.
38. Wang Y, Tang C, Yu X, et al. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. *Avian Pathol.* 2010;39:297-302.
39. Salmani H et al. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *Escherichia coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(2):e28331.
40. Wang L, Nakamura H, Kage-Nakadai E, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int J Food Microbiol.* 2017;249:44-52.
41. Canizalez-Roman A. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int J Food Microbiol.* 2013;164:36–45.

Table 1 - Primer sequence and size of products obtained used for the genes researched.^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22}

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho (pb)	Referencias
<i>bfpA</i>	(F) CAATGGTGCTTGCGCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT	326	Gunzburg et al. 1995
<i>Eae</i>	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	Paton; Paton, 1998
<i>stx1</i>	(F)ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R)AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Paton; Paton, 1998
<i>stx2</i>	(F) GGCACTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	Paton; Paton, 1998
<i>stx2a</i>	(F) GCGGTTTTATTTGCATTAGC (R) TCCCGTCAACCTTCACTGTA	256	Wang et al., 2002
<i>stx2b</i>	(F) GGTA AAAATTGAGTTCTCTAGTATA (R) CAGCAATCCTGAACCTGACG	175	Wang et al., 2002
<i>stx2c</i>	(F) GCGGTTTTATTTGCATTAGT (R) AGTACTCTTTTCCGGCCACT	124	Wang et al., 2002
<i>stx2d</i>	(F) CTTTATATACAACGGGTG (R) CTGAATTGTGACACAGATTAC	359	Zheng et al., 2008
<i>hlyA</i>	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC (R)AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Paton; Paton, 1998
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	Schmidt et al., 1995
<i>aggR</i>	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT	308	Boisen et al., 2012
<i>elt</i>	(F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATCCCTGTT	450	Aranda et al., 2004
<i>est</i>	(F) ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT (R) CACCCGGTACARGCAGGATT	190	Aranda et al., 2004
<i>ipaH</i>	(F) GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	Aranda et al., 2004
<i>arpa</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	Clermont et al., 2013
<i>chuA</i>	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	Clermont et al., 2013
<i>yjaA</i>	(F) CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont et al., 2013
<i>TspE4.C2</i>	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC (R) AGTTTATCGCTGCGGGTCCG	152	Clermont et al., 2013

Fonte: o próprio autor

Table 2 - Genotypic and phenotypic characteristics of DEC isolated from bovine ground meat.

Local de coleta	Nº dos Isolados	Perfil genotípico	Perfil de Resistência aos Antimicrobianos ^a	Adesão ^b	Filogenia	Sorotipo	Patotipos
A	1	<i>aggR, aatA</i>	AMP	AA	E	O93:H9	EAEC
B	2	<i>aggR, aatA</i>	-	AA	E	O93:H9	EAEC
C	3	<i>aggR, aatA</i>	-	AA	A	O3:H2	EAEC
D	4	<i>aggR, aatA</i>	-	AA	A	O3:H2	EAEC
E	5	<i>aggR, aatA</i>	SUT	AA	A	O3:H2	EAEC
F	6	<i>stx2a, hlyA</i>	SUT	ND	A	O152:H8	STEC
G	7	<i>stx2ND</i>	CFL	ND	A	O93:H46	STEC
H	8	<i>stx2ND</i>	-	ND	ND	O175:H7	STEC
I	9	<i>eae</i>	-	ALL	B1	O105ab:H7	aEPEC
J	10	<i>eae</i>	CFL	ALL	B1	O156:H10	aEPEC

a

Antimicrobianos: AMP, ampicilina (10 µg); SUT, sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); CFL, cefalotina (30 µg). ^b Adesão: AA, adesão agregativa; ALL, adesão agregativa-like. ND: não definido.