



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carolina Relvas Chaves

**Caracterização fenotípica e molecular de marcadores de virulência em
cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos de origens diversas**

Rio de Janeiro

2021

Carolina Relvas Chaves

**Caracterização fenotípica e molecular de marcadores de virulência em cepas de
Escherichia coli isoladas de alimentos de origens diversas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz
Coorientadores: Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade
Prof.^a Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C512 Chaves, Carolina Relvas.

Caracterização fenotípica e molecular de marcadores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos de origens diversas / Carolina Relvas Chaves – 2021.

115 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz
Coorientadores: Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade
Prof.^a Dra. Angela Corrêa de Freitas-Almeida

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Escherichia coli* – Patogenicidade – Teses. 2. *Escherichia coli* Uropatogênica. 3. Bactérias gram-negativas – Patogenicidade – Teses. 4. Inspeção de alimentos – Normas. 5. I. Queiroz, Mara Lucia Penna. II. Andrade, João Ramos Costa. III. Freitas-Almeida, Angela Corrêa de. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

CDU: 579.67

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7143

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carolina Relvas Chaves

Caracterização fenotípica e molecular de marcadores de virulência em cepas de

***Escherichia coli* isoladas de alimentos de origens diversas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 06 de julho de 2021.

Coorientadores: Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ
Prof.^a Dra. Angela Corrêa de Freitas-Almeida
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Vânia Lucia Carreira Merquior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Roberta Fontanive Miyahira
Instituto de Nutrição – UERJ

Prof.^a Dra. Débora Leandro Rama Gomes
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Denise Rosane Perdomo Azeredo
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marta e Paulo; a minha irmã Victoria e aos meus amigos Bianca e Robson.

AGRADECIMENTOS

À espiritualidade por me permitir chegar até aqui e por me ensinar, em meio a tantos contratempos, que as coisas só acontecem conforme os planos divinos, não os nossos.

A minha mãe Marta e minha irmã Victoria, por me receberem novamente em casa, após tantos anos, para realizar o curso, ao meu pai Paulo, por suportar a saudade de estar longe fisicamente e compreender a importância da minha ausência. Vocês são o meu porto seguro e sem o apoio e carinho de vocês nada teria sido possível.

Aos meus queridos amigos Bianca, Robson e Beth, pela amizade, carinho e zelo comigo nessa caminhada. Obrigada por acreditarem em mim quando tudo era escuridão, vocês são luz na minha vida!

Ao Gabriel pelo carinho, conforto nos momentos difíceis, pelo incentivo e por compreender a tensão dos momentos dedicados à conclusão deste ciclo.

A todos os amigos da família Micro UERJ, em especial Manu, Marcinha Jones, Vinícius, Carlinha, Denilson, Angélica, Raquel, Adriana, Lourdinha, Rose, Wagner, Stephanie, Lana, Miriam, Maria, Mila e Alexandre. Obrigada pela amizade, empatia, carinho, por tantos ensinamentos técnicos e de vida e pelos momentos de descontração durante os lanches da tarde. Vocês tornaram os desafios mais leves durante essa jornada.

Aos queridos mestres, Prof. José Augusto, Prof^a Vânia e Prof^a Elizabeth por compartilhar tanto conhecimento, por todos os abraços de conforto, palavras de carinho e incentivo. À Professora Ana Claudia, um agradecimento especial, pela gentileza de nos ceder alguns iniciadores para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal Fluminense *campus* Campos Guarus, em especial aos meus ex-diretores Prof. Christiano Carvalho Leal e Prof^a Monique Freitas Neto, por não terem medido esforços para que eu pudesse realizar este doutorado. Muito obrigada pela amizade e por reconhecer a importância deste título para mim e para a instituição. Agradeço também aos amigos e “nobres colegas” de trabalho no IF Fluminense, Thiago, Tarsila, Edilamar, Catia, Cris e Rogério, pelo apoio e torcida.

Aos meus orientadores Prof^a Mara, Prof Andrade e Prof^a Angela que há 20 anos me conduzem nesta trajetória acadêmica, desde a graduação até o doutorado, com o carinho e a firmeza que os “pais” dedicam a uma filha. Obrigada por compartilhar comigo o conhecimento de vocês e por me acolher carinhosamente nesta casa durante todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À UERJ, local onde provavelmente passei mais horas da minha vida nos últimos anos, agradeço pela minha formação acadêmica desde a graduação e por me capacitar profissional e academicamente para a vida. Obrigada por sua excelência!

Gratidão!

Não te deixes destruir...

Ajuntando novas pedras

e construindo novos poemas.

Recria tua vida, sempre, sempre.

Remove pedras e planta roseiras e faz doces.

Recomeça.

Cora Coralina

RESUMO

CHAVES, Carolina Relvas. **Caracterização fenotípica e molecular de marcadores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos de origens diversas.** 2021. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Os alimentos estão implicados na disseminação de cepas de *Escherichia coli* com potencial patogênico. Este trabalho objetivou investigar o perfil de virulência em 339 cepas de *E. coli*, recuperadas de alimentos, a saber: salsa (*Petroselinum crispum*); carcaças de frango congeladas; frutos do mar: mexilhões, mariscos e ostras; leite pasteurizado e preparação purê de batatas de dieta destinada a pacientes internados em um hospital universitário. Foram pesquisados, por PCR, os grupos filogenéticos e os genes de virulência: *eae*, *bfpA*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *ltA*, *est*, *ipaH*, *aggR*, *aatA*, associados à *E. coli* diarreiogênica (DEC) e os marcadores *fimH*, *papEF*, *pap GII e III*, *sfa*, *afa*, *hlyA*, *cfn1*, *traT*, *aer*, *flu* e PAI, associados à *E. coli* patogênica extra intestinal (ExPEC), especificamente *E. coli* uropatogênica. Além disso foi investigada a presença dos sorogrupos O157; O26; O45; O103; O111; O121; O145 e o antígeno flagelar H7, nas cepas O157. Cepas com perfil molecular de virulência foram submetidas a ensaios fenotípicos de aderência com células HEp-2 e cepas albergando o gene *stx2*, ao ensaio de citotoxicidade com célula Vero. Verificou-se que o grupo filogenético A foi o único que estava presente em todas as origens alimentares, tendo sido também o mais prevalente nas cepas estudadas (48%), seguido dos grupos B1 (32%), D (12%) e B2 (8%). Marcadores de virulência foram encontrados em 32,7% das cepas, dividindo-as em 29 perfis de virulência distintos, dos quais o gene *stx2*, isolada e conjuntamente a outros marcadores, foi o mais frequente, presente em 45 cepas, caracterizando-as como STEC. Nenhuma cepa apresentou marcadores associados à ETEC, EIEC e EAEC e uma única apresentou perfil molecular compatível com EPEC típica (tEPEC), porém sem apresentar fenótipo de aderência localizada. Marcadores moleculares associados às ExPEC (54%) foram mais frequentes do que os de DEC (27%) nas *E. coli* estudadas, no entanto também foram encontradas cepas com marcadores associados às duas categorias (19%). As amostras de preparação purê de batatas da dieta hospitalar foram, entre as origens estudadas, a que apresentou a mais alta frequência de marcadores de virulência (89%), sendo a maioria classificada como STEC. Entre as cepas investigadas foram encontrados os sorogrupos O121, O103 e O145, em isolados de salsa, frango e mexilhões, respectivamente. O sorogrupo O157 foi encontrado somente nas cepas provenientes de purê de batatas, entretanto estas não apresentavam o antígeno flagelar H7. Nenhuma cepa submetida ao ensaio de citotoxicidade expressou o fenótipo de produção da toxina Shiga. Foi possível concluir que alimentos de diferentes origens, incluindo alimento pronto para consumo de pacientes hospitalizados, estão veiculando cepas de *E. coli* albergando marcadores moleculares e fenotípicos de virulência, e podem exercer papel importante na disseminação destes genes. Os resultados também alertam para a importância da realização/revisão dos procedimentos de boas práticas de produção de alimentos, a fim de minimizar a veiculação desses microrganismos e a ocorrência de Doença de Origem Alimentar (DOA).

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreiogênica. *Escherichia coli* patogênica extraintestinal. Alimentos. Virulência.

ABSTRACT

CHAVES, Carolina Relvas. **Phenotypic and molecular characterization of virulence markers in *Escherichia coli* strains recovered from different food sources.** 2021. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Food is implicated in the spread of *Escherichia coli* strains with pathogenic potential. This study aimed to investigate the virulence profile in 339 strains of *E. coli*, recovered from food, namely: parsley (*Petroselinum crispum*); frozen chicken carcasses; seafood: mussels, clams, and oysters; pasteurized milk and mashed potatoes from the diet for patients admitted to a teaching hospital. Using PCR, phylogenetic groups and virulence genes were investigated, such as: *eae*, *bfpA*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *ltA*, *est*, *ipaH*, *aggR*, *aatA*, associated with diarrheagenic *E. coli* (DEC) and the markers *fimH*, *papEF*, *pap* GII and III, *sfa*, *afa*, *hlyA*, *cfn1*, *traT*, *aer*, *flu* and PAI, associated with extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), specifically uropathogenic *E. coli*. In addition, serogroups O157; O26; O45; O103; O111; O121; O145 and the H7 flagellar antigen in the O157 strains were investigated. Strains exhibiting molecular virulence profile were submitted to phenotypic adherence assays with HEp-2 cells and strains harboring the *stx2* gene to the Vero cell cytotoxicity assay. Phylogenetic group A was observed in all food sources, and it was also the most prevalent among strains in this study (48%), followed by groups B1 (32%), D (12%) and B2 (8%). Virulence markers were found in 32.7% of the strains and 29 distinct virulence profiles were observed. Highlighting the *stx2* that was the most frequent gene, alone or together other markers, observed in 45 strains, characterizing them as STEC. None strains were associated with ETEC, EIEC and EAEC and a single one exhibited molecular profile compatible with typical EPEC (tEPEC), however localized adherence phenotype was not observed. 54% and 27% of the total, exhibited molecular markers associated to ExPEC and DEC, respectively. Curiously, 19% carried genes related to both categories. Among different food source, mashed potatoes showed the highest frequency of virulence markers (89%), most of all were classified as STEC. Serogroups O121, O103 and O145 were found in parsley, chicken and mussel, respectively. Serogroup O157 was observed only in *E. coli* recovered from mashed potatoes, nevertheless H7 flagellar antigen was not present. Using cytotoxicity assay, none strain expressed the Shiga toxin production phenotype. In conclusion, foods from different sources, including ready-to-eat food for hospitalized patients, carried *E. coli* strains harboring molecular and phenotypic markers of virulence, and may play an important role in the dissemination of these genes. The results highlighted the importance of conducting/reviewing the procedures of good food production practices, in order to minimize the transmission of these microorganisms and the occurrence of foodborne diseases.

Keywords: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Food. Virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema para determinação do grupo filogenético em cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
Figura 2 -	Fluxograma das etapas experimentais realizadas.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Iniciadores utilizados para a determinação do Grupo Filogenético de <i>Escherichia coli</i>	42
Quadro 2 -	Condições de amplificação utilizadas na PCR Multiplex para determinação do Grupo Filogenético de <i>Escherichia coli</i>	42
Quadro 3 -	Iniciadores utilizados para amplificação de genes de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	44
Quadro 4 -	Cepas utilizadas como controle positivo na pesquisa de marcadores de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	44
Quadro 5 -	Condições de amplificação utilizadas na PCR simplex para detecção dos genes de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	45
Quadro 6 -	Iniciadores utilizados para amplificação de genes de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> patogênica extra intestinal	46
Quadro 7 -	Condições de amplificação utilizadas na PCR multiplex para detecção dos genes de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> patogênica extra intestinal	47
Quadro 8 -	Condições de amplificação utilizadas na PCR para a detecção do gene <i>flu</i> .	48
Quadro 9 -	Iniciadores utilizados para a determinação dos sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> O157 e não-O157	49
Quadro 10 -	Cepas utilizadas como controle positivo na determinação dos sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> O157 e não-O157	49
Quadro 11 -	Condições de amplificação utilizadas para PCR simplex na determinação dos sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> O157 e não-O157.....	50
Quadro 12 -	Iniciadores utilizados para a pesquisa do Antígeno Flagelar H7	50
Quadro 13 -	Condições de amplificação utilizadas na PCR para pesquisa do Antígeno Flagelar H7	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos Grupos Filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> de acordo com a origem de isolamento	57
Tabela 2 -	Frequência dos grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> por perfil de virulência	59
Tabela 3 -	Caracterização molecular de virulência de <i>Escherichia coli</i> por amostra e origem	60
Tabela 4 -	Cepas sorogrupadas discriminadas por diferentes origens e perfil de virulência para <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica e/ou <i>Escherichia coli</i> patogênica extra intestinal.....	64
Tabela 5 -	Fenótipos de Aderência entre as cepas de <i>Escherichia coli</i> apresentando um ou mais gene (s) de virulência.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aderência agregativa
AD	aderência difusa
A/E	lesão <i>attaching and effacing</i>
AIEC	<i>E. coli</i> aderente invasiva
APEC	<i>E. coli</i> patogênica aviária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFP	<i>Bundle-Forming Pilus</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DEC	<i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOA	Doença de Origem Alimentar
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>E. coli</i> Patogênica Extraintestinal
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FITU	infecção do trato urinário veiculada por alimentos
ITU	Infecção do trato urinário
HyPEC	<i>Escherichia coli</i> Híbrido-Patogênica
LAL	<i>Localized-Adherence Like</i>
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
MAC	complexo de ataque à membrana
MLST	<i>Multi locus sequence type</i>
MNEC	<i>E. coli</i> associada à meningite
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde

PAIs	<i>Pathogenicity Associated Islands</i>
SEPEC	<i>E. coli</i> associada à sepse
STEAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa produtora da toxina Shiga
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
VTEC	<i>E. coli</i> produtora de verocitotoxina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
μL	Microlítro
Bp	Pares de bases
Kb	Quilobases

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	37
1.1	Geral	37
1.2	Específicos	37
2	METODOLOGIA	38
2.1	Origem das cepas	38
2.1.1	<u>Condição das cepas</u>	38
2.1.2	<u>Ativação das cepas para estudo</u>	38
2.2	Confirmação da identificação das cepas de <i>Escherichia coli</i>	39
2.2.1	<u>Caracterização bioquímica por métodos convencionais</u>	39
2.2.2	<u>Identificação das cepas de <i>Escherichia coli</i> através do uso de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)</u>	40
2.3	Ensaio Molecular	40
2.3.1	<u>Obtenção de DNA</u>	40
2.3.2	<u>Ensaio Molecular para a determinação do Grupo Filogenético</u>	41
2.3.3	<u>Ensaio Molecular para a detecção de genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> Diarreiogênicas (DEC)</u>	43
2.3.4	<u>Ensaio Molecular para a detecção de genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> Extraintestinal (ExpEC)</u>	46
2.3.5	<u>Ensaio Molecular para a determinação dos sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> O157 e não-O157</u>	48
2.3.6	<u>Ensaio Molecular para pesquisa do Antígeno Flagelar H7 nas cepas de <i>Escherichia coli</i> sorogrupadas como O157</u>	50
2.3.7	<u>Corrida e interpretação da eletroforese</u>	51
2.4	Ensaio Fenotípicos	51
2.4.1	<u>Ensaio de Aderência de <i>Escherichia coli</i> utilizando a linhagem celular Hep-2</u> ...	51
2.4.2	<u>Ensaio de citotoxicidade da toxina de Shiga em cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizando a linhagem celular Vero</u>	53
3	RESULTADOS	56
3.1	Identificação das cepas	56

3.2	Determinação do grupo filogenético das cepas de <i>Escherichia coli</i>	56
3.3	Pesquisa de marcadores moleculares de virulência associados à <i>Escherichia coli</i> diarrreio gênica (DEC) e patogênica extraintestinal (ExPEC) entre as cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de diferentes origens alimentares	58
3.4	Determinação dos sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> O157 e não-O157 (“<i>Big Six</i>”).....	64
3.5	Pesquisa do Antígeno flagelar H7 nas cepas de <i>Escherichia coli</i> pertencentes ao sorogrupo O157.....	65
3.6	Determinação dos fenótipos de aderência com células HEp-2.....	65
3.7	Ensaio de citotoxicidade para Stx em cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizando a linhagem celular Vero.....	67
4	DISCUSSÃO.....	68
	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A - Origem, localidade e ano de isolamento das cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas de alimentos.....	102
	APÊNDICE B - Resumo apresentado no Congresso Latinoamericano de Microbiologia 2018	115

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos das Doenças de Origem Alimentar (DOAs)

Os alimentos são veículos importantes na disseminação de microrganismos com potencial patogênico. De acordo com o *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, Annual Report*, do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2018), somente no ano de 2016 foram relatados 839 surtos de doença de origem alimentar (DOA), acometendo 14259 pessoas, resultando em 875 hospitalizações e 17 óbitos, nos Estados Unidos da América.

Entre os principais agentes etiológicos associados aos surtos, a *E. coli*, especificamente STEC, foi o terceiro microrganismo mais envolvido em surtos alimentares e casos de DOA, precedido apenas por Norovírus e *Salmonella*. Os grupos alimentares mais frequentemente implicados nos surtos Norte Americanos, em 2016, foram, respectivamente: pescado, moluscos e laticínios (CDC, 2018).

No Brasil, apesar dos avanços nas notificações de surtos de DOAs, os dados ainda não são bem conhecidos, provavelmente devido às subnotificações ou porque os surtos não são reconhecidos, não são relatados ou mesmo por falta de investigação em várias localidades do país. Somente em alguns Estados, principalmente nos das Regiões Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), existem sistemas de vigilância sanitária efetiva (GOMES et al., 2013; TONDO et al, 2015).

De acordo com o Registro no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SINAN/SVS), do Ministério da Saúde (MS, 2019), durante o período de 2009 a 2018, no Brasil, foram registrados 6809 surtos alimentares, ocasionando 120584 casos de doença, 16632 hospitalizações e 99 óbitos. Somente no ano de 2018, foram notificados 503 surtos alimentares, com 6803 casos de doença e resultando em 731 hospitalizações e nove mortes. Os casos notificados, entre 2009 e 2018, ocorreram mais frequentemente em residências (37,2%), seguidos por restaurantes (16%), escolas (8,9%), eventos (5,7%) e hospitais (4,2%) e, entre os principais alimentos envolvidos, podem ser citados os alimentos mistos (25,5%), leite e derivados (7,8%), carne bovina (5,3%), carne de aves (3,5%), hortaliças (2,3%) e pescados e frutos do mar (2,1%). *E. coli*, foi o principal

agente etiológico bacteriano implicado nos surtos (23,4%), seguido por *Salmonella* (11,3%) e *S. aureus* (9,4%).

Segundo Amson *et al.* (2006), um modelo de rastreamento epidemiológico demonstrou que o estado do Paraná registrou, entre os anos de 1978 e 2000, cerca de 1195 surtos relacionados a doenças de origem alimentar causados por bactérias. No Rio de Janeiro são notificados aproximadamente 30 mil casos e cerca de 2000 internações por gastroenterites por ano. Do mesmo modo, no estado de São Paulo foram registrados cerca de 200 surtos no ano de 2000. Os principais alimentos responsáveis por estes surtos são os de origem animal, embora os de origem vegetal também estejam associados.

Dados epidemiológicos recentes da cidade de São Paulo, mostraram que no período entre 2007 e Fevereiro de 2021, 2606 surtos de doença veiculada por alimentos foram notificados, implicando em 25007 casos de doença. Destes, 16 casos relativos a dois surtos foram registrados somente nos dois primeiros meses de 2021 (https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/index.php?p=244330).

De acordo com dados do CDC, um surto de origem alimentar causado por *E. coli* O157:H7 ocorreu no período entre dezembro de 2020 e março de 2021, um total de 22 pessoas, majoritariamente mulheres com idades entre 10 e 95 anos, foram infectadas pela cepa relacionada ao surto, em sete estados norte americanos. Entre os acometidos, 11 foram hospitalizados e 3 desenvolveram a síndrome urêmica-hemolítica (HUS). O alimento associado não foi identificado. No entanto, as pessoas relataram comer uma variedade de itens alimentares, incluindo folhas verdes, brócolis, pepino e morangos (Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2021/o157h7-02-21/index.html>).

A implementação das Boas Práticas Agrícolas (BPA) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) são essenciais para prevenir a contaminação de alimentos, desde a sua produção primária até o consumo (CDC, 2015). As Boas Práticas são requisitos básicos para a produção de alimentos seguros. Representam o conjunto de procedimentos a serem adotados afim de reduzir a contaminação por perigos físicos, químicos e biológicos oriundos da matéria prima, água, instalações, equipamentos e utensílios, vetores, bem como das ações dos manipuladores e contaminações cruzadas. Visam, portanto, a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, bem como sua conformidade com a legislação vigente. (TONDO *et al.*, 2015).

As DOAs constituem um dos problemas sanitários mais amplamente difundidos no mundo e os contaminantes biológicos vêm sendo relacionados como uma das suas principais causas. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2007), 35,3% dos

casos de mortalidade infantil na América Latina entre 1995 e 2000 foram atribuídos a enfermidades diarréicas, sendo 70% dos casos causados por consumo de algum alimento contaminado. Dados da OMS (2015), sugerem que as doenças diarréicas são responsáveis por metade das DOAs, afetando 550 milhões de pessoas e causando 230000 mortes a cada ano, principalmente em crianças, cujo número pode chegar a 220 milhões de doentes, resultando em 96000 óbitos por ano. Diarréia também é implicada como uma das maiores causas de morte entre crianças menores de cinco anos em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, sendo bactérias, vírus e parasitas os principais agentes etiológicos envolvidos (LANATA et al., 2013; TIAN et al., 2016).

***Escherichia coli* como agente importante associado às doenças de origem alimentar (DOA)**

Entre os agentes bacterianos associados às DOAs, a *E. coli* merece destaque pois, apesar de pertencer à microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis, permanecendo, usualmente, no lúmen, como comensais e auxiliando na digestão, decomposição e proteção do intestino, podem causar infecções em indivíduos imunocomprometidos; e até mesmo em pessoas saudáveis, devido ao rompimento das barreiras intestinais (CALLEJÓN et al., 2015; BELLUCO et al., 2016; NTULI, NJAGE & BUYS, 2017; AIJUKA & BUYS, 2019; GHITA et al., 2020). Esta bactéria também merece destaque e reconhecimento pela sua habilidade de transferir horizontalmente determinantes genéticos de virulência e resistência aos antimicrobianos, intra e inter-espécie e até mesmo entre gêneros diferentes (HOVOET et al., 2013; CROXEN et al., 2013; HUTINEL et al., 2021; MAGEIROS et al., 2021; SONG et al., 2021).

E. coli também pode ser encontrada no solo e na água, geralmente como resultado de contaminação de origem fecal, por esterco animal ou despejo de esgoto sem tratamento (JOHNSON et al., 2008; CARLOS et al., 2010; McAULEY et al., 2014; WOOD et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017; FERREIRA et al., 2018). Sua recuperação a partir de alimentos indica qualidade higiênico-sanitária insatisfatória. O consumo de alimentos e água contaminados podem resultar em infecções bacterianas graves, representando grande problema de saúde pública (BALABAN & RASOOLY, 2000; LE LOIR et al., 2003; TORRES et al., 2018; TORO et al., 2018; GONZÁLEZ E CERQUEIRA, 2019).

Principais alimentos associados às doenças de origem alimentar (DOA) causadas por *Escherichia coli*

Entre os alimentos relacionados à contaminação por *E. coli*, os de origem vegetal, em especial os vegetais folhosos, merecem destaque principalmente por serem, muitas vezes, consumidos sem sofrer qualquer tratamento térmico (FRANCO & LANDGRAF, 2005; GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016; SHAKERIAN, RAHIMI & EMAD, 2016). A mudança no estilo de vida atual da população, em busca de alimentos mais saudáveis, é marcada pelo aumento no consumo de vegetais, *in natura* e minimamente processados (BAUTISTA-DE LEÓN et al., 2013; JUNG et al., 2014; GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016).

Estes alimentos carregam um risco aumentado de contaminação microbiana, em decorrência da qualidade da água de irrigação, que pode estar contaminada com esgoto não tratado ou outras formas de contaminação de origem fecal, do uso de fertilizantes orgânicos ou esterco animal compostado de maneira inadequada, da presença de animais silvestres ou domésticos no local do cultivo, proximidade a áreas urbanas, falhas no manejo da colheita, transporte, armazenamento, contaminação cruzada no processamento (no caso dos minimamente processados), na comercialização e na manipulação doméstica ou em serviços de alimentação (TABAN & HALKMAN, 2011; SHAKERIAN, RAHIMI & EMAD, 2016; KHALIL & GOMAA, 2017).

Os alimentos de origem animal estão entre os principais envolvidos nos casos de surtos alimentares notificados no Brasil, entre os anos de 2008 e 2018, segundo dados do SINAN/SVS (MS, 2019). Entre estes alimentos, a carne de frango, os frutos do mar e laticínios ocupam posição de destaque. Deve-se considerar que o consumo de carne de frango é elevado no Brasil, chegando ao *per capita* de 43 Kg por ano (ABPA, 2016) e que a aquicultura é um importante setor de produção de alimentos, de acordo com a *United Nations Food and Agriculture Organization* (FAO, 2013). Os frutos do mar comercializados e consumidos no Brasil são comumente cultivados em águas costeiras que recebem efluentes urbanos, o que causa um aumento no número de bactérias de origem fecal, favorecendo fortemente a associação destes alimentos à ocorrência de surtos de doença alimentar (FUSCO et al., 2013).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite no mundo e o consumo *per capita* deste alimento foi estimado em 170 litros, em 2020 (MILKPOINT, 2020). A contaminação do produto pode estar associada, ainda na produção, a riscos como mastite bovina, ordenha e

manipulação inadequadas e falta de condições higienico-sanitárias na fazenda (AWADALLAH et al., 2016). Mais de 700 casos de DOA ligados ao consumo de leite de vaca são notificados, por ano, nos Estados Unidos, sendo os produtos não pasteurizados responsáveis por 95% dos eventos, visto que a ingestão de leite cru e seus derivados aumentam em até 800 vezes o risco de doenças. O processo de pasteurização, quando executado de maneira efetiva, é capaz de reduzir significativamente a carga de patógenos no leite e, desta forma, minimizar as DOAs veiculadas por leite e derivados (COSTARD et al., 2017), ainda assim, existem relatos na literatura da presença de *E. coli* em amostras de leite pasteurizado (SILVA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2006; MANNA et al., 2010; ; HOFFMANN et al., 2014; KOUSHKI et al., 2016).

A contaminação dos alimentos por *E. coli* também representa importantes riscos econômicos, especialmente em um mundo globalizado. De acordo com dados publicados pela OMS, o surto de *E. coli* O104:H4, veiculado por alimento, em 2011, na Alemanha, gerou uma perda de US \$ 1,3 bilhão para os agricultores e indústrias e exigiu US\$ 236 milhões em ajuda de emergência para 22 países membros da União Européia, naquele ano (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>).

Classificação sorológica de *Escherichia coli*

A membrana externa de bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, apresenta lipopolissacarídeos (LPS) compostos por lipídio A, oligossacarídeos centrais e um polissacarídeo único, denominado antígeno O. A perda deste antígeno O implica na atenuação da virulência da cepa, sugerindo sua importância na interação patógeno-hospedeiro. A diversidade antigênica tem sido utilizada como biomarcadores para a classificação de *E. coli* há muitas décadas (FRATAMICO et al., 2016).

Este microrganismo está envolvido nas infecções do trato gastrointestinal, do trato urinário, pneumonia hospitalar, infecções de corrente sanguínea, infecções de sítio cirúrgico, síndrome urêmica-hemolítica e meningite. A classificação clássica de *E. coli* se baseia na identificação e associação dos antígenos “O” (somático), “K” (polissacarídeo capsular) e “H” (flagelar). Atualmente, em torno de 171 antígenos somáticos (antígeno O), 55 antígenos flagelares (Antígeno H) e 80 capsulares (antígeno K) foram identificados, caracterizando cerca de 160 tipos sorológicos distintos de *E. coli* (SAROWSKA et al., 2019).

O método tradicional para a determinação de sorogrupos de *E. coli* é baseado em reação de aglutinação do antígeno O com antissoros, geralmente produzidos em coelhos, contra cada sorogrupo O. Esta técnica é laboriosa e passível de erros interpretativos. A determinação do sorogrupo por métodos moleculares é uma alternativa mais eficiente e leva em consideração a pesquisa dos genes cromossomais que codificam uma proteína que promove a translocação do antígeno O pela membrana externa (*wzx*) e uma enzima responsável pela sua polimerização (*wzy*) (FRATAMICO et al., 2016).

Entre os sorogrupos mais associados à DOA, O157, prevalente entre *E. coli* produtoras de toxina shiga (STEC) é o mais amplamente associado às doenças humanas, como diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica (HUS), podendo evoluir para óbito. Muitos outros sorogrupos são associados às doenças em humanos, porém O26, O45, O103, O111, O121 e O145, mundialmente denominados “*Big Six*” se encontram entre os sorogrupos não O-157 mais prevalentes em doenças alimentares nos Estados Unidos e outros países (USDA, 2012; EFSA, 2013; GOULD et al., 2013; TORO et al., 2018; SHRIDHAR et al., 2019).

Entre as ExPEC, o sorogrupo O25 se destaca como importante patógeno associado a resistência múltipla aos antimicrobianos. Os sorogrupos O11, O17 e O77 são considerados responsáveis por infecções do trato urinário e pelas mais graves infecções extraintestinais. Já os sorogrupos O1, O2 e O18, denominado grupo clonal APEC (*E. coli* patogênica aviária) também se destacam por serem possíveis patógenos emergentes em humanos (MANGES & JOHNSON et al., 2015).

Grupos Filogenéticos de *Escherichia coli*

Devido à complexidade da pesquisa dos grupos filogenéticos pela técnica do *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), Clermont e seus colaboradores (2000) desenvolveram uma técnica simples e rápida, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), baseada na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e *tspE4.C2* como marcadores filogenéticos, para classificar as cepas de *E. coli* em quatro principais grupos filogenéticos incluindo A, B1, B2 e D.

O gene cromossomal *chuA*, homólogo ao gene *chuA* de *Shigella dysenteriae*, foi inicialmente encontrado em cepas de *E. coli* O157:H7 e está relacionado ao sistema de transporte de ferro (TORRES; PAYNE, 1997). O gene *yjaA*, encontrado primeiramente no

genoma de *E. coli* K-12, codifica uma proteína hipotética com função desconhecida (BLATTNER, 1997). Já o gene *tspE4.C2*, anteriormente denominado fragmento anônimo de DNA *tspE4.C2*, codifica uma lipase esterase putativa (GORDON et al., 2008).

Segundo Lecointre et al. (1998), os grupos B2 e D eram grupos relacionados que, evolutivamente, adquiriram o gene *chuA*, presente em um ancestral comum; já os grupos A e B1, durante a evolução perderam esse gene. Isso também foi observado por Clermont et al. (2000). A diferenciação entre os grupos B2 e D se deu pela detecção do gene *yjaA* – presente na totalidade das amostras do grupo filogenético B2 e ausente nas do grupo D. Os grupos A e B1 se diferenciam pela ausência do gene *TspE4.C2* (CLERMONT et al., 2000).

As cepas comensais, não-patogênicas pertencem majoritariamente aos grupos filogenéticos A e B1, porém é possível que linhagens pertencentes a estes grupos apresentem genes de virulência. Cepas patogênicas aos humanos e animais, geralmente, pertencem aos grupos B2 e D, respectivamente (CLERMONT et al., 2000, JOHNSON et al., 2008). É provável que linhagens diarreiogênicas (DEC) sejam derivadas dos grupos filogenéticos A, B1 e D e as ExPEC pertençam, prioritariamente, ao grupo B2 e, em menor grau, ao grupo D (JOHNSON & RUSSO, 2002).

Em 2013, Clermont e colaboradores propuseram uma nova classificação, dividindo as *E. coli* em 8 grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F ou Clade I. O grupo C alberga cepas relacionadas, porém distintas, as do grupo B1 e o grupo F, as do grupo B2. O grupo E designa um pequeno número de cepas anteriormente não classificadas, nas quais se inclui o sorotipo O157:H7. Foi proposto que a Clade I fosse incluída como um grupo filogenético devido à alta taxa de recombinação genética observada entre as cepas deste grupo.

Mais recentemente, Clermont et al. (2019) definiram mais um grupo filogenético, intimamente relacionado, porém distinto ao filogrupo B2, denominado grupo filogenético G. Este filogrupo contempla cepas virulentas relacionadas a infecções extraintestinais, com capacidade de causar sepse em modelos murinos e, geralmente associadas à resistência múltipla aos antimicrobianos.

***Escherichia coli* patogênicas**

E. coli é uma bactéria pertencente à microbiota normal do intestino de humanos e outros animais de sangue quente e répteis, tendo a camada de muco do ceco e cólon como

ambiente natural. Ao longo do processo evolutivo, esta espécie adquiriu elementos genéticos que lhe permitiu colonizar outros habitats, como água, solo e superfícies abióticas, mas também transformou algumas cepas em bactérias patogênicas (KOTŁOWSKI et al., 2020). Dependendo do local da infecção, as cepas patogênicas de *E. coli* podem ser classificadas em dois grupos principais denominados *E. coli* diarreiogênica (DEC) ou *E. coli* patogênica intestinal (IPEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004; ROBINS-BROWN et al., 2016; KOTŁOWSKI et al., 2020).

***Escherichia coli* Diarreiogênica (DEC)**

Os patótipos de *E. coli* que estão associados às doenças intestinais são conhecidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC) ou *E. coli* patogênica intestinal (IPEC), embora nem todos os subtipos deste grupo necessariamente causem diarreia (ROBINS-BROWN et al., 2016). De acordo com os fatores de virulência, padrões e efeitos de aderência às células hospedeiras, produção de toxinas e invasividade, as DEC são classificadas em: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* difusamente aderente (DAEC); *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (NATARO & KAPER, 1998) e *E. coli* invasiva aderente (AIEC), relacionada à doença de Crohn (CROXEN et al., 2013; ROBINS-BROWN et al., 2016; KOTŁOWSKI et al., 2020).

***Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)**

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo a ser identificado. O termo EPEC foi utilizado, em 1955, para descrever estirpes de *E. coli* epidemiologicamente relacionadas à diarreia aguda em crianças menores de 5 anos (NETER et al., 1955). Foram descritas como patótipos muito prevalentes em ambientes comunitários como escolas e hospitais (PARK et al., 2014). Estudos descrevem que além dos humanos, EPEC também pode infectar animais, como gado, cães, gatos e coelhos (SINGH et al., 2015). A dose infectante em adultos saudáveis é estimada em 10^8 organismos e os principais sintomas

relacionados à doença compreendem diarreia aquosa (geralmente autolimitada), dor abdominal, náusea, vômito e febre (CROXEN et al., 2013).

As cepas de EPEC são conhecidas por sua capacidade de produzir a lesão *attaching and effacing* (A/E) na superfície das células intestinais, devido à presença do *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), uma ilha de patogenicidade que compreende os genes responsáveis pela lesão A/E (NATARO et al., 1998). As EPEC podem ser subdivididas em típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC, respectivamente), se diferenciando pelo plasmídeo de virulência EAF (fator de aderência em EPEC), presente apenas nas EPEC típicas. Este plasmídeo contém um conjunto de genes responsável pela codificação de um pílus, denominado *Bundle-Forming Pilus* (BFP), responsável pela interligação de bactérias em micro colônias na superfície das células epiteliais formando um padrão de aderência localizada (LA) (DONNENBERG et al., 1992; GAYTÁN et al., 2016 PINAUD et al., 2018). Já as aEPEC não apresentam o plasmídeo e produzem padrões de aderência diferentes de LA, tais como *Localized-Adherence Like* (LAL), aderência agregativa (AA) e aderência difusa (AD) (ABE et al., 2009).

Segundo Dias et al. (2015), os principais marcadores de virulência frequentemente utilizados para a identificação e classificação das *E. coli* enteropatogênicas são: a região LEE (carreando o gene *eae*), o plasmídeo EAF (contendo os genes *bfpA/bfpB*) e a ausência de genes *stx* (*stx1* e/ou *stx2*). A presença da região LEE (*eae*) e do plasmídeo EAF (*bfpA/bfpB*), caracterizam as EPEC típicas enquanto a ausência do plasmídeo EAF (*bfpA/bfpB*), indica as EPEC atípicas.

***Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC)**

E. coli produtoras de toxina Shiga (STEC), também conhecidas como *E. coli* produtoras de verocitotoxina (VTEC), são caracterizadas pela presença dos genes *stx1* e/ou *stx2*, tipicamente adquirido por bacteriófago. Este patotipo é bastante diverso e pode ocasionar diarreia com ou sem a presença de sangue, febre, cólicas abdominais, vômitos e, em casos mais graves, a síndrome urêmico-hemolítica (HUS). Nesse grupo, encontram-se as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), que tem a capacidade de destruir células epiteliais e são originalmente associadas à colite hemorrágica, sendo grande foco de controle em saúde pública (NATARO et al., 1998; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

A infecção por STEC ocorre principalmente por meio da ingestão ou manipulação de alimentos contaminados, como carne moída mal cozida, leite cru, salada, alho-poró e batatas, verduras, frutas e outros alimentos implicados em surtos (FENG, 2014; HERMAN et al. 2015; KIM, LEE & KIM, 2020) e pelo contato direto com com animais infectados, sendo os bovinos considerados um dos principais reservatórios do patógeno (TORO et al., 2018; KIM, LEE & KIM, 2020). A contaminação interpessoal é possível mediante um contato muito próximo, no ambiente doméstico, entre membros da família; em ambientes escolares, asilos para idosos, entre outros (BUSANI et al., 2006). A dose infectante de STEC necessária para causar infecção em humanos é baixa, menos de 10^3 células já é capaz de ocasionar sintomas da doença (KARMALI, 2009).

Mais de 400 sorotipos de STEC são descritos relacionados às doenças humanas no mundo. Entre eles O157: H7 tem sido o mais frequentemente implicado. Acredita-se que o sorotipo STEC O157: H7 tenha evoluído a partir de uma cepa EPEC O55: H7 não toxigênica, fermentadora de sorbitol, que, em determinado momento evolutivo, adquiriu o gene *stx* (*stx1* e/ou *stx2*) e, simultaneamente, perdeu a capacidade de fermentar o açúcar (PENNINGTON, 2010). No entanto, cepas de STEC não-O157 vêm sendo associadas à doença em vários países, como China (LI et al., 2016), Argentina (ETCHEVERRÍA et al., 2010), Chile (TORO et al., 2018) e Estados Unidos (JU et al., 2012), principalmente pelo consumo de alimentos de origem animal. Os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 são conhecidos como “*Big six*” (SHRIDHAR et al., 2019; GOULD et al., 2013; EFSA, 2013; USDA, 2012), sendo considerados os principais sorogrupos de STEC não-O157 associados à causa de doença de origem alimentar nos Estados Unidos (USDA, 2012) e em outros países (EFSA, 2013).

As cepas EHEC geralmente apresentam a região LEE, sendo capazes de aderir à células HEp-2 de forma semelhante às EPEC. Entre os principais fatores de virulência, podem ser destacados: exotoxina (Stx), capaz de inibir a síntese protéica e danificar as células por apoptose, a intimina e seu receptor translocado (Tir), o sistema de secreção do tipo-III (T3SS) e o operon da hemolisina (*hly*). Algumas cepas de STEC podem apresentar um fenótipo hemolítico diferente da alfa-hemolisina de *E. coli*. Estas cepas são denominadas enterohemolíticas e apresentam genes plasmidiais que codificam a enterohemolisina, ao contrário da alfa-hemolisina, cujos genes são cromossomais (BEUTIN et al., 1989; CAVALCANTI et al., 2020; KOTŁOWSKI et al., 2020).

A identificação molecular das STEC está frequentemente relacionada à pesquisa da presença dos genes que codificam a toxina Stx (*stx1* e/ou *stx2*). Quando, além dos genes que

codificam a toxina, a região LEE também (gene *eae*) é encontrada, tal fato indica se tratar de uma EHEC (DIAS et al., 2015; ROBINS-BROWN et al., 2016).

***Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC)**

EIEC é um patógeno intracelular facultativo capaz de causar disenteria. Estudos filogenéticos sugerem que EIEC tenha evoluído da *Shigella* spp., visto que está mais intimamente relacionada a esta espécie do que às *E. coli* não invasivas. De acordo com o padrão do antígeno O, as EIEC são classificadas em 21 subtipos principais e poucas EIEC apresentam o antígeno H (CROXEN et al., 2013). Os mecanismos de virulência de EIEC derivaram, principalmente, da aquisição do plasmídeo pINV e de outros elementos genéticos móveis associados à virulência que codificam a capacidade de invadir tecidos hospedeiros (JOHNSON & NOLAN, 2009; ROBINS-BROWN et al., 2016). A detecção do marcador molecular *ipaH* é, de acordo com Dias et al. (2015), o critério mais frequentemente usado para indicar a presença do plasmídeo pINV, para caracterizar cepas de EIEC.

A mucosa colônica é o local de infecção de EIEC, onde a invasão de células M, macrófagos e células epiteliais ocorre resultando em diarreia aquosa ou, em casos mais graves, seguida de sangue e muco. Ao contrário da *Shigella*, cuja dose infectante é baixíssima, cerca de 10 organismos, a EIEC necessita de 10^6 células para causar infecções em humanos. Os principais sintomas relacionados a este patotipo podem variar de diarreia leve e aquosa a desordem inflamatória grave, caracterizada por fortes dores abdominais, febre, calafrios e disenteria, podendo ser fatal em casos mais graves da doença (NATARO et al., 1995; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Estudos demonstram que EAEC é o patotipo mais encontrado em amostras de fezes diarreicas (COHEN et al., 2005; NATARO et al., 2006; MODGII et al., 2020) e está associado à diarreia dos viajantes, assim como as ETEC, e vem sendo associado à diarreia persistente em crianças imunocomprometidas, em países industrializados (CROXEN et al.,

2010). A descoberta das EAEC decorreu de estudos realizados com células HEp-2 que demonstraram que essas cepas eram capazes de aderir às células formando um “padrão de tijolos empilhados” (NATARO, 2005).

As EAEC albergam um plasmídeo de aderência agregativa (pAA) que codifica os fatores de virulência, a saber: fímbrias de aderência agregativa I, II, III, IV e V (AAF-I / *aggA*; AAF-II / *aafA*; AAF-III / *agg3A*, AAF-IV / *agg4A*; AAF-V / *agg5A*, respectivamente), toxina codificada por plasmídeo (Pet); toxina enteroagregativa termoestável 1 (EAST-1 / *astA*), enterotoxina (ShET-2), uma dispersina (responsável pela dispersão das EAEC na mucosa intestinal) e o ativador transcricional AggR (*aggR*), um regulador que controla o número de fatores de virulência codificados pelo plasmídeo pAA e por ilhas de patogenicidade no cromossomo. A maioria das cepas está associada à presença do gene *aggR* (EAEC típica), enquanto as cepas atípicas não carregam esse gene (NATARO, 2005; HARRINGTON et al., 2006; MODGIL et al., 2020). Desta forma, a detecção molecular do plasmídeo EAEC, cujos marcadores moleculares mais utilizados são os genes *aggR* e/ou *aatA*, caracteriza as EAEC (DIAS et al., 2015).

Algumas cepas de EAEC carregam além dos genes característicos deste patotipo, os genes *stx*, da toxina Shiga, presentes nas STEC. Como exemplo, pode ser citado o patotipo híbrido de *E. coli* O104:H4 que foi responsável por um importante surto alimentar na Europa, principalmente na Alemanha, no ano de 2011. A infecção por este patógeno acarretou em sintomas severos como colite hemorrágica e a HUS, além de grande prejuízo econômico. Uma vez que a EAEC O104:H4 sem o gene *stx* já havia sido isolada no continente africano, acredita-se que o patotipo híbrido tenha evoluído a partir de uma EAEC O104:H4 que recebeu o gene *stx* carregado pelo bacteriófago (SHRIDHAR et al., 2018).

***Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC é o principal agente etiológico da diarreia dos viajantes, principalmente em países em desenvolvimento e regiões sub-tropicais, como a América Latina, Caribe, sudeste da Ásia e África, sendo considerado endêmico em muitos países em desenvolvimento (Quadri et al., 2005; ROBINS-BROWN et al., 2016). Apesar de ser raro em países desenvolvidos, esse patotipo já foi isolado em surtos na Dinamarca, Japão e Coreia (ETHELBERG et al., 2010; HARADA et al., 2013; MacDONALD et al., 2015).

Esse patotipo carrega um conjunto de fatores de colonização para adesão ao epitélio do intestino delgado, tais como o antígeno do fator de colonização (CFA), um antígeno de superfície-coli (CS) ou fator de colonização putativa (PCF). Após a adesão aos enterócitos, a ETEC produz uma toxina termoestável (ST) e/ ou toxina termolábil (LT) que, ao serem secretadas, interagem com os enterócitos, aumentando a secreção no lúmen intestinal, causando diarreia intensa. (NATARO et al., 1998; CROXEN et al., 2013; ROBINS-BROWN et al., 2016; MIRSEPASI-LAURIDSEN et al., 2019). A detecção da presença da toxina termolábil (LT), codificada pelo gene *ltA* ou da toxina termoestável (ST), codificada pelo gene *est*, é frequentemente utilizada, de acordo com Dias et al. (2015), para caracterizar, geneticamente, uma cepa de ETEC.

Os principais sintomas associados às ETEC, além da diarreia aquosa são: dor abdominal, vômito e febre, que podem durar cerca de três a cinco dias. Doença ocasionada por este patotipo é geralmente veiculada por água e alimentos contaminados, dificilmente, por contato interpessoal. A dose infectante para adultos saudáveis é cerca de 10^8 células; já em crianças, os sintomas podem aparecer com um número de células inferior. (HARADA et al., 2013).

***Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC)**

DAEC compreende um grupo bastante heterogêneo e é assim denominada devido ao padrão de aderência difusa gerado nas células HeLa e HEp-2. Este patotipo tem sido relacionado à diarreia aquosa que pode se tornar persistente em criança, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, bem como às infecções recorrentes do trato urinário. As bactérias aderem-se de forma difusa sobre a superfície celular, por meio de dois tipos de adesinas, descritos até o momento. Um grupo de DAEC é dependente de uma proteína autotransportadora AIDA-I e outro grupo depende de um grupo de adesinas que são codificadas por operons que incluem adesinas fimbriais e afimbriais, denominadas Afa-Dr (JAFARI et al., 2012; MEZA-SEGURA et al., 2020).

Já foi demonstrado que DAEC e tEAEC são filogeneticamente relacionadas. No entanto, abrigam genes que codificam para diferentes fatores de virulência. DAEC estão mais associadas a genes que codificam sideróforos, enquanto tEAEC alberga genes que codificam toxinas e bacteriocinas (MEZA-SEGURA et al., 2020).

***Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC)**

As cepas de ExPEC já foram reconhecidas como o patógeno Gram-negativo mais comum em humanos (POOLMAN & WACKER, 2016; WASIŃSKI, 2019). Este patotipo de *E. coli* é muito diverso, sendo capaz de colonizar vários nichos ecológicos, o corpo humano e animais (SINGER, 2015). A ExPEC tem como principal reservatório o trato gastrointestinal, onde, normalmente, não causam doenças. Fora deste habitat, no entanto, eles podem causar infecções de tecidos ou órgãos que sejam susceptíveis aos fatores de virulência albergados pelas cepas. Fatores de virulência relacionados à colonização bacteriana estão entre as características mais importantes deste patotipo, sendo um aspecto que o diferencia das *E. coli* comensais (MANGES, 2016; WASIŃSKI, 2019).

Entre os fatores de virulência, característicos das ExPEC, podem ser citadas as adesinas fimbriais e afimbriais, sistemas de aquisição de ferro, cápsula e toxinas como a hemolisina (MANGES, 2016). O agrupamento filogenético é uma classificação que permite a distinção de *E. coli* em um de oito grupos: A, B1, B2, C, D, E, F e clado críptico 1 (CLERMONT et al., 2013). A maioria das ExPEC são classificadas em filogrupos B2 e D (CLERMONT et al., 2013; MARKLAND et al., 2015; WASIŃSKI, 2019).

Ao contrário das DEC, as ExPEC são definidas levando-se em consideração o local de isolamento. Os grupos ExPEC clinicamente mais importantes são UPEC, *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada à sepse (SEPEC) e APEC, causadora de coccidiose em aves que representa a maior doença infecciosa nesses animais, ocasionando perdas econômicas importantes para os produtores, devido a alta mortalidade e prejuízo à produção. (KAPER et al., 2004; MALUTA et al., 2014; JOHNSON & RUSSO, 2018).

As infecções causadas por ExPEC são geralmente oportunistas, ou seja, ocorrem com mais frequência em hospedeiros que estão comprometidos de alguma forma, como por exemplo ter um trato urinário disfuncional ou apresentar imunocomprometimento sistêmico devido à neutropenia ou extremos de idade (WASIŃSKI, 2019; SANTOS et al., 2020). Considerando que as ExPEC são capazes de causar infecção em diversos locais extra-intestinais, é possível que uma UPEC em humanos, por exemplo, também possa causar infecções em outros locais do organismo humano ou até mesmo em animais. Desta forma, a utilização do termo ExPEC pode ser mais conveniente do que a própria designação do patotipo (RUSSO E JOHNSON, 2000).

Não há um único ou conjunto de fatores de virulência exclusivamente associados a um hospedeiro específico ou doença, no entanto, a capacidade das cepas ExPEC de causar doenças em indivíduos imunocompetentes foram associados à presença de dois ou mais genes entre cinco marcadores de virulência a saber: *pap* (fímbrias P), *sfa* (Sfimbriae), *afa/dra* (adesinas AFA-Dr), *iuc/iut* (aerobactina) e *kpsMTII* (grupo capsular II) (RUSSO & JOHNSON, 2000; JOHNSON et al., 2003; KÖHLER & DOBRINDT, 2011; KOTŁOWSKI et al., 2020; RILEY, 2020).

Reservatórios de *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC)

O trato intestinal humano é a principal fonte de ExPEC. No entanto, ainda não está totalmente elucidada a forma exata como esses microrganismos atingem este sítio ou se são naturalmente pertencentes à microbiota de indivíduos saudáveis. Ao ganharem outras regiões do corpo, podem persistir e causar doenças, tais como ITU, por meio de transmissão fecal-perineal-vaginal-uretral. Além disso, podem acessar a corrente sanguínea, por translocação da barreira intestinal e até mesmo serem veiculadas por contato sexual, causando infecções extra-intestinais subsequentes (MANGES & JOHNSON, 2015).

A veiculação de ExPEC por alimentos vem sendo estudada e, apesar de todos os grupos alimentares serem descritos como possíveis veículos de disseminação, destacam-se os de origem animal, especialmente as aves, e os de origem vegetal, devido à má qualidade da água de irrigação (VINCENT et al., 2010; XIA et al., 2011; NORDSTROM et al., 2013; MEENA et al., 2020; RILEY, 2020). Acredita-se que a via de transmissão se deva à colonização assintomática do indivíduo posterior ao consumo de alimentos, crus ou mal cozidos ou contaminados após a cocção, por estirpes de ExPEC que persistem no trato intestinal humano até que ocorram circunstâncias favoráveis a uma infecção extraintestinal (MANGES & JOHNSON, 2015; MEENA et al., 2020; RILEY, 2020).

As hipóteses de que aves domésticas poderiam ser um veículo importante na disseminação de doenças de origem alimentar em humanos e que sejam reservatório de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos vem sendo suportadas pela observação de características comuns entre APEC e UPEC, tais como sorogrupos, perfis genotípicos de virulência, perfis filogenéticos por tipificação de sequências multilocus (MLST) e padrões

muito próximos de PFGE (BERGERON et al., 2012; MALUTA et al., 2014, MAGEIROS et al., 2021).

Em estudo sobre o potencial zoonótico de *E. coli* isoladas de carne de frango e ovos, Mitchell e colaboradores (2015), sugeriram que a carne de frango é um importante veículo de disseminação de ExPEC e os ovos também podem estar envolvidos nesta disseminação, em menor grau, provavelmente devido aos processos de higienização adotados. Posteriormente, o potencial patogênico em causar sepse, meningite e ITU, foi demonstrado por Mellata et al. (2018), em modelos de roedores.

Cepas de ExPEC também foram isoladas em suínos e em carne de porco e, no estudo de Manges e colaboradores (2007) foram observadas associações epidemiológicas entre o consumo frequente de carne de frango e porco com o desenvolvimento de ITU por *E. coli* com resistência a múltiplas drogas antimicrobianas. Pouca associação entre ExPEC e carne bovina foi observada por Ramchandani et al. (2005), sugerindo que o gado de corte seja um reservatório de menor importância.

Veiculação de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) por alimentos como causa de infecção do trato urinário (ITU)

ExPEC, especificamente UPEC, foi descrito como principal agente etiológico de ITU no mundo, sendo responsável por cerca de 80 a 90% dos casos (MARKLAND et al., 2015). O termo FUTU (infecção do trato urinário veiculada por alimentos) foi adotado para descrever as ITU ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por UPEC (NORDSTROM et al., 2013). Estes autores sugerem que as FUTU apresentam etiologia bastante diferente das infecções do trato gastrointestinal, ocorrendo em duas etapas: a primeira compreende a ingestão do uropatógeno pelo hospedeiro susceptível e, na segunda etapa, uma determinada dose infectante do patógeno é transferida do trato gastrointestinal para o urinário.

Forte relação clonal já foi evidenciada entre cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU comunitária e carne (frango de corte e suínos), geográfica e temporalmente combinadas, e demonstraram a capacidade dessas cepas em causar ITU ascendente em modelo murino (JAKOBSEN et al., 2012) e outros estudos também mostraram que aves e carne de aves comercializadas no varejo carregavam cepas de UPEC (LIU et al, 2018; YAMAJI et al., 2018),

fornecendo evidências importantes de que ITU pode ser uma doença possivelmente causada por cepas veiculadas por alimentos.

Principais fatores de virulência em *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

As ExPEC são microorganismos que apresentam uma considerável plasticidade em seu genoma e grande variedade de fatores de virulência, tais como adesinas, toxinas, sideróforos, polissacarídeos capsulares e invasinas que, usualmente, são codificados por genes localizados em ilhas de patogenicidade (PAIs), plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis (SAROWSKA et al., 2019; DENAMUR et al., 2021).

UPEC apresentam diversos fatores de virulência que podem ser agrupados em fatores associados à superfície da bactéria, entre os quais estão as fímbrias e pili; e fatores secretados e exportados para o sítio alvo, como as toxinas. As adesinas capacitam as UPEC a se ligar às células do epitélio urinário e a evitar que sejam removidas pelo fluxo de urina. As adesinas mais comuns em UPEC são a fímbria Tipo I, fímbria P, S/F1C e as adesinas da família Dr (MULVEY, 2002; SAROWSKA et al., 2019; KATONGOLE et al., 2020).

A fímbria Tipo 1 tem sido considerada o mais importante fator de virulência responsável pela manutenção da ITU. É altamente conservada tanto em UPEC como em cepas comensais e é composta por uma haste helicoidal, resultante de subunidades repetidas de FimA, acoplada a uma pequena estrutura de 3nm contendo uma adesina na ponta, FimH e duas proteínas adaptadoras, FimF e FimG (MULVEY et al., 1998; SABATE et al., 2006; SPURBECK et al., 2012; SCHEINBERG et al., 2017).

O segundo fator de virulência mais comum nas UPEC é a fímbria P. Esta estrutura desempenha função importante na patogênese de ITU ascendente e pielonefrite em humanos. Esta fímbria é uma haste de 6,8nm de comprimento e é composta por subunidades repetidas de PapA arranjadas em formato helicoidal. A subunidade PapH ancora a PapA à membrana externa. A ponta fibrilar contém uma adesina, PapG, localizada na porção distal, que está associada a outras três subunidades PapE, PapF e PapK (WAKSMAN & HULTGREN, 2009; LÜTHJE & BRAUNER, 2014; KADRY, AL-KASHEF & EL'GANINY, 2020).

A fímbria S tem sido associada à ITU por sua participação na ligação das UPEC às células epiteliais renais e do trato urinário baixo. Esta fímbria apresenta estrutura semelhante à encontrada nas fímbrias Tipo 1 e P. Ela é composta por uma subunidade maior, denominada

SfaA, que apresenta característica de adesina, e por três subunidades menores, AfaG, SfaH e SfaS (MULVEY, 2002; LÜTHJE & BRAUNER, 2014; SAROWSKA et al., 2019).

O grupo das adesinas da família Dr também comporta as adesinas afimbriais (AFA-I, AFA-II, AFA-III, AFA-IV, Nfa-I e Dr-II). Os integrantes deste grupo promovem a colonização ascendente e a infecção crônica do trato urinário, participando da aderência às células epiteliais da bexiga e dos rins, estando associados aos processos de cistite e pielonefrite (MULVEY, 2002; AIJUKA et al., 2018; CRUZ SPANO et al., 2017).

As toxinas são importantes fatores de virulência presentes nas infecções causadas por *E. coli*, ocasionando resposta inflamatória e possivelmente, contribuindo para o aparecimento de sintomas na ITU (MULVEY, 2002). O Fator de Necrose Citotóxico 1 (CNF1), proteína de 113KDa codificada pelo gene cromossomal *cnf1*, é uma toxina associada à UPEC transportada à célula alvo por meio de vesículas, uma vez que a UPEC não possui Sistema de Secreção Tipo III para injetar moléculas na célula hospedeira. Este fator está relacionado à capacidade de invasão renal (WILES et al., 2008; KATONGOLE et al., 2020).

O fator de virulência mais importante, secretado pela UPEC, é a lipoproteína α -hemolisina (HlyA), codificada pelo gene cromossomal *hlyA* e secretada pelo sistema de Secreção Tipo I. Este fator está associado a infecções do trato urinário alto (pielonefrite). A toxina HlyA forma poros na membrana e atua sobre várias células como eritrócitos, fibroblastos embrionários e adultos, granulócitos, macrófagos e linfócitos, além de ser capaz de lisar eritrócitos e células epiteliais renais humanas (SUBASHCHANDRABOSE & MOBLEY, 2015; KATONGOLE et al., 2020).

Sideróforos são moléculas secretadas que possuem alta afinidade pelo íon férrico. Alguns têm a função de capturar o ferro do ambiente e outros atuam por liberar o ferro da transferrina e lactoferrina e, subsequentemente, concentrar no citosol bacteriano. Em *E. coli* o receptor de ferro aerobactina tem sido fortemente associado a cistite, pielonefrite e bacteremia em oposição a bacteriúria assintomática (JOHNSON & STELL, 2000; WILES et al., 2008; LÜTHJE & BRAUNER, 2014; MOREIRA DA SILVA et al., 2017).

Proteínas autotransportadoras (AT) representam uma grande família de proteínas secretoras e de membrana externa presentes em diversas bactérias Gram-negativas. Elas também são frequentemente associadas às funções de adesão, agregação, toxicidade e formação de biofilme. A proteína Ag43, codificadas pelo gene *ag43* ou *flu*, é uma das mais bem estudadas da família AT e é encontrada em muitos patótipos de *E. coli*, incluindo a UPEC (VAN DER WOUDE & HENDERSON, 2008; SUBASHCHANDRABOSE & MOBLEY, 2015; MONTERO et al., 2017; TORRES et al., 2018).

A lipoproteína de membrana externa TraT está envolvida nas interações entre a bactéria, a célula eucariótica e o meio ambiente. Ela é codificada pelo gene *traT* e está usualmente associada a plasmídeos. TraT confere um moderado grau de resistência à ação lítica do sistema complemento, promovendo a resistência ao soro, provavelmente pela inativação do complexo de ataque à membrana (MAC) (MELLATA et al., 2003; FIROOZEH et al., 2014; MÜELLER, STEPHAN & NÜESCH-INDERBINEN, 2016; MUNKHDELGER et al., 2017; MOREIRA DA SILVA et al., 2017).

Muitos fatores de virulência são usualmente codificados por elementos genéticos flexíveis denominados Ilhas Associadas à Patogenicidade (*Pathogenicity Associated Islands* – PAIs). Estas são regiões móveis de DNA inseridas nas proximidades ou dentro de genes de tRNA. O conteúdo G-C destas regiões difere de outras regiões do cromossoma. A transferência de PAIs é importante para a evolução da virulência da UPEC, pois codificam adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, mecanismos de secreção e cápsulas. UPEC possui várias PAIs, podendo inclusive ter fatores de virulência que são codificados por mais de uma ilha de patogenicidade (SUBASHCHANDRABOSE & MOBLEY, 2015; SAROWSKA et al., 2019; DENAMUR et al., 2021).

***Escherichia coli* Heteropatogênica e Híbrido-patogênica (HyPEC)**

Embora a classificação das cepas de *E. coli* em ExPEC leve em consideração o local de isolamento, o tipo de hospedeiro e a doença que causam, a maioria das DEC são subdivididas em diferentes patotipos com base na presença de marcadores de virulência específicos diretamente relacionados ao desenvolvimento da doença. Estas classificações de *E. coli* tiveram que ser repensadas após o surto de colite hemorrágica e HUS, relacionado ao consumo de alimento de origem vegetal, causado por uma cepa de *E. coli* O104:H4, albergando fatores de virulência associados a dois patotipos distintos de DEC (EAEC e STEC), na Alemanha, em 2011 (SHRIDHAR et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

Exemplos de cepas híbridas foram relatados em *E. coli*, como a cepa STEC/ExPEC O80:H2, que causou HUS e bacteremia devido à presença de genes *stx₂* e *eae* de STECs e plasmídeo semelhante a pS88, descrito em meningite, urosepsia e cepas de APEC (Mariani-Kurkdjian et al., 2014) e a cepa STEC/UPEC sorotipo O2:H6, uma STEC albergando genes

de virulência como *hlyA*, *cnf1* e *clb* de UPEC que têm a capacidade de causar diarreia e infecções do trato urinário (Bielaszewska et al., 2014).

O surgimento de cepas híbridas e heteropatogênicas ocorre graças à plasticidade genética do microrganismo. Esses híbridos genéticos são ameaças emergentes que surgem devido a aquisições e mutações genéticas, sendo os elementos genéticos móveis os principais responsáveis pelo aparecimento das novas cepas, albergando marcadores moleculares de diferentes patotipos de *E. coli* (BRAZ, MELCHIOR & MOREIRA, 2020).

Desta forma, os termos *E. coli* heteropatogênica e *E. coli* híbrido-patogênica (HyPEC) vêm sendo utilizados para descrever combinações emergentes de fatores de virulência entre os patotipos clássicos de *E. coli*. O primeiro termo se referencia às cepas que albergam genes de virulência característicos de dois ou mais patotipos de DEC, o que faz com que os heteropatógenos sejam estritamente patógenos entéricos. A ausência de marcadores moleculares de virulência definidos para DAEC e AIEC é uma limitação para estas definições. Por outro lado, as cepas híbrido-patogênicas são aquelas que albergam marcadores moleculares de virulência associados à DEC e à ExPEC simultaneamente, ou as que são isoladas de infecção extraintestinal e exibem e/ou codificam fatores de virulência de DEC (BRAZ, MELCHIOR & MOREIRA, 2020; SANTOS et al., 2020).

A possibilidade de diferentes patotipos de *E. coli* serem veiculados em diferentes matrizes alimentares merece atenção, uma vez que são sabidamente potenciais agentes etiológicos de DOAs. A relevância do presente estudo se fundamenta na pesquisa dos marcadores moleculares e fenotípicos de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de origens alimentares distintas, tais como alimentos consumidos crus ou, em alguns casos, submetidos a tratamento térmico insuficiente ou prontos para consumo de pacientes hospitalizados. Acreditamos que os resultados encontrados são de grande importância para a compreensão da distribuição/veiculação de atributos genéticos de virulência de DEC e ExPEC por meio de alimentos comercializados/preparados em diferentes localidades do Brasil.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Investigar o perfil de virulência em cepas de *Escherichia coli* recuperadas de purê de batatas da dieta de um hospital universitário no município do Rio de Janeiro e outros alimentos comercializados em diferentes localidades do Brasil.

1.2 Específicos

- a) Determinar o grupo filogenético das cepas de *E. coli*;
- b) Investigar a presença de marcadores moleculares de virulência associados à *E. coli* diarreio gênicas (DEC) dos patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC);
- c) Identificar a presença de marcadores moleculares de virulência associados à *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC), especificamente *E. coli* uropatogênica (UPEC);
- d) Pesquisar os sorogrupos de *E. coli* mais frequentemente associados à doença de origem alimentar no mundo (O157; O26; O45; O103; O111; O121 e O145);
- e) Investigar a presença do antígeno flagelar H7 nas cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O157;
- f) Verificar as características fenotípicas de aderência às células HEp-2 nas cepas com atributos moleculares de virulência;
- g) Avaliar a citotoxicidade das cepas de *E. coli* albergando o gene *stx2* em linhagem de células Vero.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das cepas bacterianas

Foram estudadas 339 cepas de *E. coli* previamente isoladas de alimentos de diversas origens, a saber: salsa (*Petroselinum crispum*) fresca (n=44) e minimamente processada (n=55), comercializadas no município de Bom Jesus do Itabapoana (RJ) (VEIGA, 2014); carcaças de frango congeladas do tipo tradicional, orgânico e exportação (n=58), comercializadas na cidade do Rio de Janeiro (RJ) (MATOS, 2017); frutos do mar: mexilhões *in natura* (n=31) e aferventados (n=7) coletados na costa da praia de Itaipu e de mercado varejista (n=31), na cidade de Niterói (RJ) (JAYME, 2018); mariscos (chumbinho e sururu) (n=27) comercializados em Salvador (BA) e ostras de água doce (n=64) provenientes de fazendas de ostreicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos (BA) (OLMEDO, 2016); leite pasteurizado (n=13) comercializado na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (RJ) (CIRINO, 2017) e preparação mista pronta para consumo purê de batatas (n=9), destinada a pacientes de um hospital universitário do município do Rio de Janeiro (RJ) (GOMES, 2017) (APÊNDICE A).

2.1.1 Condição das cepas

As cepas se encontravam estocadas à -20°C, mantidas em tubos de 1,5mL contendo meio *Skim Milk* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) adicionado de 10% de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha), na Coleção de bactérias da Disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

2.1.2 Ativação das cepas para estudo

As cepas de *E. coli* foram semeadas, a partir do estoque a -20°C, para tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion - OXOID, Cambridge, UK) e incubadas a

35-37° C por 18-24h. Em seguida, foram semeadas por esgotamento em ágar EMB (Eosina Azul de Metileno - OXOID, Cambridge, UK) e incubadas a 35-37°C por 18-24h. Observando-se o crescimento de colônias características em EMB, cinco colônias de cada cepa foram semeadas em placas contendo ágar TSA (Tryptone Soya Agar - OXOID, Cambridge, UK) e incubadas a 35-37° C por 18-24h, a fim de obter crescimento confluyente.

2.2 Confirmação da identificação das cepas de *Escherichia coli*

Estes procedimentos foram realizados nas cepas isoladas de salsa (n=99) (VEIGA, 2014), considerando que as cepas isoladas de outras origens/alimentos já tinham sido submetidas aos métodos de identificação convencionais, bem como à espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) e identificadas como *E. coli* em trabalhos anteriormente realizados por nosso grupo (OLMEDO, 2016; CIRINO, 2017; GOMES, 2017; MATOS, 2017; JAYME, 2018).

2.2.1 Caracterização bioquímica por métodos convencionais

A identificação bioquímica foi realizada utilizando-se os seguintes testes (NATARO et al., 2011): produção de indol, H₂S e mobilidade (SIM - OXOID, Cambridge, UK), fermentação da glicose (produção de gás), lactose, sorbitol e sacarose, produção de urease (Christensen) (OXOID, Cambridge, UK), teste de utilização do citrato e malonato (OXOID, Cambridge, UK), via metabólica da utilização da glicose (VM/VP), descarboxilação dos aminoácidos ornitina e lisina e di-hidroilação do aminoácido arginina (OXOID, Cambridge, UK). Os ensaios foram realizados a partir de cultura recente (18-24h a 35°C ±2°C) obtida em ágar Nutriente (OXOID, Cambridge, UK).

2.2.2 Identificação das cepas de *Escherichia coli* através do uso de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)

As cepas de *E. coli* isoladas de salsa (n=99) também foram identificadas utilizando a técnica de espectrometria de massa (*Matrix-assisted laser diffusion ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF-MS).

As cepas foram semeadas em meio TSA e, com auxílio de um palito de madeira, uma pequena porção da colônia isolada no meio foi retirada e aplicada em um poço da placa 96 MSP (Bruker Daltonik GmbH, Alemanha). A cada poço foi adicionada uma alíquota de 10µL de matriz ácido alfa ciano hidroxicinâmico (CHCA – Bruker Daltonik GmbH, Alemanha), e deixado secar em temperatura ambiente.

A placa 96 MSP foi então inserida ao aparelho microflex - MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik GmbH, Alemanha) para obtenção da identificação bacteriana. Neste aparelho, a preparação realizada em cada poço é exposta a pulsos de *laser*, ocorrendo a dessorção de moléculas ionizadas na fase gasosa. As moléculas são então aceleradas por potenciais elétricos num tubo de vôo até um espectrômetro de massa, com a separação de biomarcadores determinados pela relação entre sua massa e carga elétrica. O espectro gerado é então comparado com outros presentes na biblioteca do programa flexControl 3.4 (Bruker Daltonik GmbH, Alemanha), gerando um *score* de identificação, de acordo com o grau de similaridade entre os espectros (MURRAY, 2012). Por recomendação do fabricante, as amostras cujo *score* foi igual ou superior a 2,0 foram identificadas até o nível de espécie, enquanto aquelas com *score* inferior a 2,0 e superior a 1,7 foram identificadas até o nível gênero.

2.3 Ensaio Moleculares

2.3.1 Obtenção de DNA

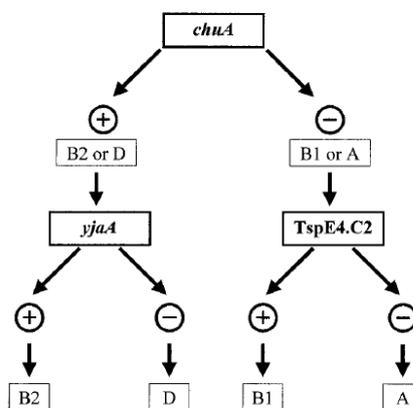
O DNA total das cepas isoladas foi obtido através do método de lise térmica. Foi transferido, com auxílio de ponteira nova e estéril, o crescimento em massa de cada cepa, obtido em TSA, para um tubo *Eppendorf*® novo e estéril, contendo 600 µL de água miliQ

também estéril. Os *ependorfs* foram submetidos a banho maria fervente durante 10 minutos e posterior choque térmico por banho de gelo, por 20-30 minutos. Em seguida, as cepas foram centrifugadas a 13500 rpm por 2 minutos em centrífuga *Eppendorf*® (modelo 5415C), a fim de permitir o depósito dos *debris* celulares. Os sobrenadantes obtidos na centrifugação, contendo o DNA das bactérias teste, denominados extrato, foram utilizados nas diversas PCR e, posteriormente, congelados (-20°C) para possíveis futuras utilizações, por período máximo de 30 dias.

2.3.2 Ensaio Molecular para a determinação do Grupo Filogenético

A pesquisa dos grupos filogenéticos foi realizada de acordo com a metodologia determinada por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), que propõe a realização de técnica de PCR tríplice com os genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA *tspE4.C2*. A classificação do grupo filogenético foi realizada pela combinação da detecção dos genes e fragmento (Figura 1). Como controles positivos, utilizou-se as cepas EAEC 042, filogrupos B2, ECPR4301 e ECPR4401 pertencentes à Coleção de bactérias da DIMI e como controle da reação foi utilizado o produto sem DNA, acrescido de 5µL de água milliQ estéril.

Figura 1 – Esquema para determinação do grupo filogenético em cepas de *Escherichia coli*



Legenda: Presença (+); Ausência (-)

Fonte: CLERMONT, BONACORSI & BINGEN (2000)

A reação apresentou volume final de 25 μ L. A mistura dos reagentes para a execução da PCR (MIX de reagentes) continha 2,5 μ L tampão da Taq 10X (Invitrogen), MgCl₂ (1,5mM), dNTP (2mM), Taq DNA Polimerase 5U/ml (Invitrogen), a qual foram acrescidos de 5 μ L do extrato contendo DNA molde. A concentração dos iniciadores nas reações era de 20pmol cada. Foram utilizados iniciadores específicos para os genes *chuA* e *yjaA* e fragmentos de DNA *tspE4.C2*, já descritos na literatura (Quadro 1). Tanto o DNA molde quanto a mistura da reação (MIX) foram manipulados em fluxo laminar, bem como todos os tubos contendo os reagentes e as reações permaneceram em banho de gelo até o início do procedimento no termociclador modelo PTC-100TM (MJ Research Watertown, MA, USA), segundo programação indicada no Quadro 2.

Quadro 1 - Iniciadores utilizados para a determinação do Grupo Filogenético de *Escherichia coli*

Gene alvo	Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>chuA</i>	ChuA 1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	ChuA 2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	YjaA 1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
	YjaA 2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>tspE4.C2</i>	TspE4C2 1	GAGTAATGTCCGGGGCATTCA	152
	TspE4C2 2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Fonte: CLERMONT, BONACORSI & BINGEN (2000)

Quadro 2 - Condições de amplificação utilizadas na PCR Multiplex para determinação do Grupo Filogenético de *Escherichia coli*

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	30
Anelamento	55°C	30 seg	30
Extensão	72°C	30 seg	30
Extensão	72°C	7 min	1

Fonte: CLERMONT, BONACORSI & BINGEN (2000)

2.3.3 Ensaio Molecular para a detecção de genes de virulência associados à *Escherichia coli* Diarreio gênicas (DEC)

Os ensaios para a detecção de genes de virulência para *E. coli* diarreio gênicas foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita por Dias *et al.* (2016), modificada. Para cada reação, 5µL de DNA molde foram acrescidos de 2,5µL Tampão PCR 10X (2mM) (Invitrogen, Gaithersburg, EUA); dNTP (2mM) (Invitrogen); MgCl₂ (1,5mM) (Invitrogen); iniciadores (sense e anti-sense) (20pmol cada) e Taq DNA polimerase (5 U/mL) (Invitrogen), totalizando volume final de 25 µL. Tanto o DNA molde quanto a mistura da reação (MIX) foram manipulados em fluxo laminar, bem como todos os tubos contendo os reagentes e as reações foram mantidos em banho de gelo até o início do procedimento no termociclador modelo PTC-100TM (MJ Research Watertown).

Para a pesquisa dos marcadores de virulência de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) foram empregados pares de oligonucleotídeos que codificam os seguintes genes a saber: *eae* (REID *et al.*, 1999); *bfpA* (TORNIEPORTH *et al.*, 1995); *bfpB* (MÜLLER *et al.*, 2007) ; *stx1*; *stx2* (PATON *et al.*, 1998); *ltA* (SCHULTSZ *et al.*, 1994); *est* (ARANDA *et al.*, 2007); *ipaH*; *aggR* (TOMA *et al.*, 2003) e *aatA* (SCHMIDT *et al.*, 1995). Todos foram adquiridos da marca Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, EUA). As sequências dos iniciadores e os pesos moleculares dos produtos amplificados são mostrados na Quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores utilizados para amplificação de genes de virulência associados à *Escherichia coli* diarréio-gênica

Gene alvo	Produto	Iniciadores	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>eae</i>	Intimina	<i>eae</i> F <i>eae</i> R	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	917	52
<i>bfpA</i>	Fímbria BFP A	<i>bfpA</i> F <i>bfpA</i> R	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	52
<i>bfpB</i>	Fímbria BFP B	<i>bfpB</i> F <i>bfpB</i> R	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	910	63
<i>stx1</i>	Toxina de Shiga	<i>stx1</i> F <i>stx1</i> R	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	52
<i>stx2</i>	Toxina Stx	<i>stx2</i> F <i>stx2</i> R	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	49
<i>ltA</i>	Enterotoxina termolábil	<i>ltA</i> F <i>ltA</i> R	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	322	50
<i>est</i>	Enterotoxina termoestável	<i>Est</i> F <i>Est</i> R	ATTTTTMTTCTGTATTRCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	52
<i>ipaH</i>	Proteína de invasão	<i>ipaH</i> F <i>ipaH</i> R	GTTCCCTTGACCGCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	619	52
<i>aggR</i>	Fímbrias de aderência agregativa	<i>aggR</i> F <i>aggR</i> R	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	52
<i>aatA</i>	Proteína de Membrana	<i>aatA</i> F <i>aatA</i> R	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	55

Fonte: DIAS et al. (2016)

As cepas controle para cada gene pertencem à Coleção de culturas da DIMI e estão descritas na Quadro 4. Como controle da reação foi utilizado o produto sem DNA, acrescido de 5µL de água milliQ estéril.

Quadro 4 – Cepas utilizadas como controle positivo na pesquisa de marcadores de virulência associados à *Escherichia coli* diarréio-gênica

Gene alvo	Categorias de DEC associadas	Controles positivos
<i>eae</i>	tEPEC	E2348/69
<i>bfpA</i>	tEPEC	E20513
<i>bfpB</i>	tEPEC	E20513
<i>ltA</i>	EPEC	ATCC258909-3
<i>est</i>	EPEC	ATCC258909-3
<i>stx1</i>	STEC	EDL 933
<i>stx2</i>	STEC	EDL 933
<i>aggR</i>	EAEC	042
<i>ipaH</i>	EIEC	E20851
<i>aatA</i>	EAEC	042

Legenda: tEPEC (*E. coli* enteropatogênica típica), EPEC (*E. coli* enterotoxigênica), STEC (*E. coli* produtora de toxina shiga), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e EIEC (*E. coli* enteroinvasora)

Fonte: DIAS et al. (2016)

As reações foram conduzidas em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research Watertown) e os programas específicos para cada gene estão descritos no Quadro 5, segundo Dias et al. (2016).

Quadro 5 - Condições de amplificação utilizadas na PCR simplex para detecção dos genes de virulência associados à *Escherichia coli* diarréiogênica

Gene alvo	Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
<i>eae</i>	Desnaturação	94°C	5 min	1
	Desnaturação	94°C	1 min	30
	Anelamento	53°C	2 min	30
	Extensão	72°C	3 min	30
	Extensão	72°C	10 min	1
<i>bfpA</i>	Desnaturação	94°C	5 min	1
	Desnaturação	94°C	1 min	30
	Anelamento	54°C	2 min	30
	Extensão	72°C	1 min	30
	Extensão	72°C	5 min	1
<i>bfpB</i>	Desnaturação	94°C	5 min	1
	Desnaturação	94°C	30 seg	30
	Anelamento	63°C	30 seg	30
	Extensão	72°C	1min 30 seg	30
	Extensão	72°C	5 min	1
<i>stx1 e stx2</i>	Desnaturação	95°C	5 min	1
	Desnaturação	95°C	1 min	35
	Anelamento	50°C	2 min	35
	Extensão	72°C	1min 30 seg	35
	Extensão	72°C	10 min	1
<i>lta</i>	Desnaturação	94°C	5 min	1
	Desnaturação	95°C	1 min	35
	Anelamento	50°C	1 min	35
	Extensão	72°C	2 min	35
	Extensão	72°C	5 min	1
<i>est</i>	Desnaturação	50°C	2 min	1
	Desnaturação	95°C	5 min	1
	Desnaturação	95°C	1 min	40
	Anelamento	50°C	1 min	40
	Extensão	72°C	1 min	40
<i>ipaH</i>	Desnaturação	95°C	5 min	1
	Desnaturação	95°C	1 min	30
	Anelamento	52°C	1 min	30
	Extensão	72°C	1 min	30
	Extensão	72°C	10 min	1
<i>aggR</i>	Desnaturação	95°C	5 min	1
	Desnaturação	95°C	1 min	30
	Anelamento	52°C	1 min	30
	Extensão	72°C	1 min	30
	Extensão	72°C	10 min	1
<i>aatA</i>	Desnaturação	94°C	5 min	1
	Desnaturação	94°C	40 seg	30
	Anelamento	53°C	1 min	30
	Extensão	72°C	1 min	30
	Extensão	72°C	10 min	1

Fonte: DIAS et al. (2016)

2.3.4 Ensaio Molecular para a detecção de genes de virulência associados à *Escherichia coli* Extraintestinal (ExPEC)

Para a pesquisa dos marcadores de virulência de ExPEC foram realizados ensaios de PCR para a detecção da presença de 11 genes incluindo *fimH* (fimbria tipo 1), *papEF* (pilus associado a pielonefrite), *pap GII e III* (pilus associado a pielonefrite), *sfa* (fimbria S), *afa* (adesina afimbrial), *hly* (α -hemolisina), *cnf* (fator citotóxico necrosante 1), *traT* (gene associado a soro resistência), *aer* (sideróforo aerobactina), *PAI* (marcador de ilha de patogenicidade de pielonefrite), *flu* (proteína autotransportadora Ag43), com a utilização de iniciadores específicos para cada gene descritos na literatura (Quadro 6).

Quadro 6 - Iniciadores utilizados para amplificação de genes de virulência associados à *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

Gene alvo	Descrição	Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Tamanho fragmento amplificado	Referência
Adesinas					
<i>fimH</i>	Tipo 1	fimH F fimH R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508 bp	Johnson & Stell, 2000
<i>papEF</i>	Fimbria P	PapEF F PapEF R	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336 bp	Yamamoto et al., 1995
<i>pap GII e III</i>	Fimbria P	pGf pG	CTGTAATTACGGAAGTGATTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	1070 bp	Johnson & Stell, 2000
<i>Sfa</i>	Fimbria S	Sfa 1 Sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAACCTGGCA	410 bp	Yamamoto et al., 1995
<i>Afa</i>	Afimbrial	Afa F Afa R	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTGTTCGTCCGCCCG	7750 bp	Yamamoto et al., 1995
Toxinas					
<i>hlyA</i>	Hemolisina	hly F hly R	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTGTTCGTCCGCCCG	11177 bp	Yamamoto et al., 1995
<i>cnf1</i>	Fator necrosante citotóxico	cnf 1 cnf 2	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTTCAGAGTCTGCCCTCATTATT	498 bp	Yamamoto et al., 1995
Evasina					
<i>traT</i>	Proteína de membrana	TraT F TraT R	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCTGAG	290 bp	Johnson & Stell, 2000
Sideróforo					
<i>aer</i>	Aerobactina	aer F aer R	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602 bp	Yamamoto et al., 1995
Ilhas de Patogenicidade					
PAI	Elementos genéticos móveis	RPAi f RPAi r	GGACATCCTGGTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	930 bp	Johnson & Stell, 2000
Proteína Auto transportadora					
<i>Flu</i>	Ag43	AG43 F AG43 R	CTGGAAACCGGTGCCCCTT CCTGAACGCCAGGGTGATA	433 bp	Henderson e Owen, 1999

Para a detecção dos genes *papEF*, *papG II e III*, *cnf1* e *hly* utilizou-se protocolo de PCR multiplex, denominado como “PCR multiplex 1” de acordo com a metodologia descrita por Yamamoto *et al.* (1995) modificada, no qual foi realizada uma mistura de reação com volume final de 25 µL contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (40mM), Taq Platinum DNA Polymerase[®] (1,5U/ µL) (Invitrogen), 0,3mM de cada iniciador e 5 µL do extrato contendo DNA. A cepa *E. coli* UPEC I64, da bacterioteca da disciplina de Microbiologia e Imunologia, foi usada como controle positivo.

A reação denominada “PCR multiplex 2” foi realizada para detectar a presença dos genes *afa* e *sfa* de acordo com a metodologia descrita por Yamamoto et al. (1995), modificada. A amplificação foi realizada com uma mistura de reação com volume final de 25 µL, contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (25 µM), Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen) e 5 µL do extrato contendo DNA. A concentração dos iniciadores nas reações foi de 10 pmol cada. Como controle positivo também foi utilizada a cepa UPEC I64.

A reação denominada “PCR multiplex 3” foi utilizada para a detecção dos genes que codificam *PAI* e *traT*, conforme metodologia descrita por Johnson & Stell (2000), modificada. O volume final das reações foi de 25 µl, contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,2mM), Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen) e 5 µL do extrato contendo DNA. A concentração dos iniciadores nas reações foi de 10pmol cada. Como controle positivo utilizou-se a cepa UPEC I64.

Para os genes *fimH* e *aer* foram realizadas reações simplex de acordo com a metodologia proposta por Yamamoto et al. (1995) modificada, conforme discriminado no parágrafo anterior. Para a reação de detecção de *fimH* utilizou-se como controle positivo a cepa UPEC I64 e para *aer*, a UPEC 54.

As reações foram conduzidas em termociclador modelo PTC-100TM (MJ Research Watertown) com um programa único para os ensaios descritos acima de acordo com a metodologia descrita por Yamamoto et al. (1995) (Quadro 7).

Quadro 7 - Condições de amplificação utilizadas na PCR multiplex para detecção dos genes de virulência associados à *Escherichia coli* patogênica extra intestinal

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	30
Anelamento	63°C	30 seg	30
Extensão	72°C	1min 30 seg	30
Extensão	72°C	5 min	1

Fonte: YAMAMOTO et al. (1995)

Para a detecção do gene da proteína autotransportadora Ag43, *flu*, realizou-se uma PCR simplex de acordo com a metodologia descrita por Restieri et al. (2007), modificada. A amplificação utilizou uma mistura de reação com volume final de 25µL, contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,2mM), Taq DNA Polimerase 1U (Invitrogen) e 5µL do extrato contendo DNA. A concentração dos iniciadores nas reações foi de 20pmol cada. A cepa EHEC EDL 933 foi utilizada como controle positivo. A programação específica para o termociclador, de acordo com a técnica proposta por Restieri et al. (2004), está descrita no Quadro 8.

Quadro 8 - Condições de amplificação utilizadas na PCR para a detecção do gene *flu*

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	95°C	1 min	1
Desnaturação	95°C	1 min	30
Anelamento	58°C	1 min	30
Extensão	72°C	1min 20 seg	30
Extensão	72°C	10 min	1

Fonte: RESTIERI et al. (2004)

2.3.5 Ensaio Molecular para a determinação dos sorogrupos de *Escherichia coli* O157 e não-O157

Para a determinação dos sorogrupos de *E. coli* foram realizados ensaios de PCR para a detecção da presença dos antígenos O, polissacarídicos, por meio da pesquisa de 7 genes a saber: *wzyO157*, *wzxO26*, *wzxO45*, *wzyO103*, *wzxO111*, *wzyO121*, *wzyO145*, conforme metodologia proposta por Toro *et al.* (2018), modificada, utilizando iniciadores específicos para cada gene, descritos por Toro *et al.* (2013), indicados na Quadro 9.

Quadro 9 - Iniciadores utilizados para a determinação dos sorogrupos de *Escherichia coli* O157 e não-O157

Gene alvo	Iniciadores	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (bp)
wzyO157	wzyO157F	TCGTTCTGAATTGGTGTGCTCA	278
	wzyO157R	TCGTTCTGAATTGGTGTGCTCA	
wzxO26	wzxO26F	GTGTGTCTGGTTCGTATTTTTATCTG	438
	wzxO26R	CCTTATATCCCAATATAGTACCCACCC	
wzxO45	wzxO45F	GGTCGATAACTGGTATGCAATATG	341
	wzxO45R	CTAGGCAGAAAGCTATCAACCAC	
wzyO103	wzyO103F	TTATACAAATGGCGTGGATTGGAG	385
	wzyO103R	TGCAGACACATGAAAAGTTGATGC	
wzxO111	wzxO111F	GCGTTTGGCTATTCTAAAGTAC	362
	wzxO111R	TTATTCCTCGCAACATCGAAG	
wzyO121	wzyO121F	AGTGGGGAAGGGCGTTACTTATC	366
	wzyO121R	CAATGAGTGCAGGCAAAATGGAG	
wzyO145	wzyO145F	CCTGTCTGTTGCTTCAGCCCTTT	392
	wzyO145R	CTGTGCGCAACCACTGCTAAT	

Fonte: Toro et al. (2013)

Para a determinação dos sorogrupos utilizou-se protocolo de PCR, segundo metodologia descrita por Toro et al. (2019) modificada, no qual foi realizada uma mistura de volume final de 25 µL contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (40mM), Taq Platinum DNA Polymerase[®] (1,5U/ µL) (Invitrogen), 40nM de cada iniciador e 1µL do extrato contendo DNA. As cepas de *E. coli*, pertencentes à Coleção de bactérias da DIMI usadas como controle positivo estão descritas no Quadro 10. A programação específica para o termociclador, de acordo com a técnica proposta por Toro et al. (2013), está descrita no Quadro 11.

Quadro 10 – Cepas utilizadas como controle positivo na determinação dos sorogrupos de *Escherichia coli* O157 e não-O157

Genes	Sorogrupo	Controles positivos
wzyO157	O157	EDL 933
wzxO26	O26	E3323
wzxO45	O45	ExPEC108
wzyO103	O103	O651/1
wzxO111	O111	E20513
wzyO121	O121	EC 1012
wzyO145	O145	EC1540

Fonte: Coleção de bactérias da DIMI-UERJ

Quadro 11 - Condições de amplificação utilizadas para PCR simplex na determinação dos sorogrupos de *Escherichia coli* O157 e não-O157

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	30
Anelamento	56°C	1min 30seg	30
Extensão	72°C	1min 30seg	30
Extensão	72°C	10 min	1

Fonte: Toro et al. (2013)

2.3.6 Ensaio Molecular para pesquisa do Antígeno Flagelar H7 nas cepas de *Escherichia coli* sorogrupadas como O157

Para a pesquisa do antígeno flagelar H7 nas cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O157 foram realizados ensaios de PCR para a detecção da presença do gene *fliC_{H7}*, conforme metodologia proposta por Gannon et al. (1997), modificada, utilizando iniciadores específicos para o gene, indicados na Quadro 12.

Quadro 12- Iniciadores utilizados para a pesquisa do Antígeno Flagelar H7

Gene alvo	Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>fliC_{H7}</i>	<i>fliC_{H7}-F</i> <i>fliC_{H7}-R</i>	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625

Fonte: Gannon et al. (1997)

Para a pesquisa do antígeno flagelar H7 utilizou-se protocolo de PCR, segundo metodologia proposta por Gannon et al. (1997) modificada, no qual foi realizada uma mistura de volume final de 25 µL contendo tampão da Taq 1X, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,2mM), Taq Platinum DNA Polymerase[®] (1,5U/ µL) (Invitrogen), 0,2µM de cada iniciador e 2µL do extrato contendo DNA. A cepa de *E. coli* EDL933, pertencente à Coleção de bactérias da DIMI, foi usada como controle positivo. A programação específica para o termociclador, de acordo com a técnica proposta por Gannon et al. (1997), está descrita no Quadro 13.

Quadro 13 - Condições de amplificação utilizadas na PCR para pesquisa do Antígeno Flagelar H7

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	15 seg	35
Anelamento	65°C	15seg	35
Extensão	72°C	1min 15seg	35
Extensão	72°C	5 min	1

Fonte: Gannon et al. (1997)

2.3.7 Corrida e interpretação da eletroforese

Aos produtos da reação da PCR foram acrescidos 5µL de azul de bromotimol, para facilitar a aplicação no gel, bem como permitir a visualização da corrida eletroforética. Foi utilizado gel de agarose 1,5%, preparado em tampão Tris (10,78 g/L) Borato (5,5 g/L) EDTA (0,58 g/L) (TBE) 1X, adicionado de 2 µL de SYBR® Safe DNA (Invitrogen). Foram aplicados 5µL de cada produto da PCR aos poços, iniciando-se a corrida em cuba contendo TBE 1X, durante 40 minutos a 100 Volts e 100 mA. A revelação ocorreu em transiluminador UV (UVP; Company Seven, Montpellier, MD, EUA) e as imagens foram registradas pelo sistema de captura digital de imagem (Launch Doc It'LS – UVP, versão 6.7.1). Determinou-se o tamanho dos produtos da PCR por comparação com um padrão de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).

2.4 **Ensaio Fenotípicos**

2.4.1 Ensaio de Aderência de *Escherichia coli* utilizando a linhagem celular HEp-2

Para determinar o fenótipo de aderência nas cepas de *E. coli* que apresentaram algum marcador genotípico de virulência, utilizou-se a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), modificada. Para tal, foi usada a linhagem de células HEp-2 (ATCC CCL23), originadas de células tumorais de carcinoma de laringe humana. As células foram cultivadas em frascos plásticos com faces planas (Nunc Int., Rochester, NY, USA), contendo 5mL de meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium, Gibco-BRL) suplementado com gentamicina 50µg/mL, fungizona 2,5 µg/mL e 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-BRL).

As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de ar-5% de CO₂ por cerca de 2 a 3 dias, até atingir a semi-confluência. O subcultivo foi realizado a cada 2-3 dias.

Para o subcultivo das células HEp-2, as monocamadas foram recobertas com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2%, EDTA 0,02% em PBS 0,001M, pH 7,2) (BIRD; FORRESTER, 1981). Após a remoção da solução, as células foram desprendidas da superfície lisa por pipetagem com meio de cultura completo. A suspensão resultante foi então dividida em dois novos frascos e incubados a 37°C/CO₂ até a confluência das monocamadas celulares.

As cepas foram inoculadas (5 µL) em 5 mL de caldo LB (Luria Broth, Merck®) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 18 horas, sob condições aeróbicas.

Para os testes de aderência, utilizamos células cultivadas sobre lamínulas (13 mm. diâmetro) dispostas no fundo dos poços de microplacas de 24 orifícios (Nunc). As monocamadas celulares semi-confluentes formadas foram lavadas uma vez com PBS-D pH 7,2 e recobertas com 1 mL do meio de cultura MEM com SFB 2% e D-manose 1%. Após esta etapa, inoculou-se em cada poço 100µL da cultura bacteriana em caldo LB diluída em PBS (0,1M, pH7,2) de forma a conter 10⁸ UFC/mL e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C em ar-5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL PBS-D e fixadas com 1mL de metanol P.A. por 15 minutos. Para a coloração utilizou-se o corante Giemsa (Merck) diluído 1:30 (v/v) em PBS (pH 6,5) por 12h, lavando-se com água destilada em seguida. As lamínulas após serem retiradas dos orifícios e secas, em estufa, foram dispostas sobre lamínula de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck S. A., Rio de Janeiro) e observadas em microscópio óptico modelo Eclipse E200 (Nikon) com objetivas de 40X e 100X.

As cepas cujo resultado não tenha sido elucidado no ensaio de 3h de incubação, foram submetidas a um novo ensaio de aderência de 6h de incubação, seguindo o mesmo procedimento descrito acima. No entanto, ao atingir o tempo de incubação de 3 horas as células foram lavadas com PBS por uma vez e novamente recobertas com meio MEM com SFB 2% (1mL) e D-manose 1% (1mL), incubando-se por mais 3 horas.

Como controles positivos foram utilizadas as cepas de *E. coli* de EAEC 042 e EPEC E2348/69 pertencentes a Coleção de bactérias da DIMI, para os padrões agregativo e localizado, respectivamente. Orifícios sem a presença de cepas bacterianas foram considerados como controles do teste. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.2 Ensaio de citotoxicidade da toxina de Shiga em cepas *Escherichia coli* utilizando a linhagem celular Vero

Para determinar a citotoxicidade em cepas de *E. coli* albergando o gene *stx2* utilizou-se a metodologia de obtenção convencional e a alternativa como proposta por Karmali et al. (1985). Inicialmente, as cepas de *E. coli* foram semeadas em 5ml de caldo Penassay (Antibiotic Medium no. 3, Difco), em tubos 16x100mm e incubadas sob agitação contínua a 37°C, por 20-24h.

Para a obtenção convencional da toxina de Shiga, foram transferidos 1,5ml do cultivo para tubo tipo Eppendorf limpo que foi submetido a centrifugação durante 5 minutos, a 13500 rpm. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana Millipore (0,22 micras).

A obtenção da toxina de Shiga pela técnica alternativa foi realizada a partir do precipitado bacteriano obtido na centrifugação que foi ressuscitado em 1,5ml de solução de sulfato de polimixina B (0,1mg/ml) e incubado em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Após incubação, a suspensão foi submetida à centrifugação durante 5 minutos a 13500rpm e o sobrenadante (extrato) foi recolhido em tubo tipo Eppendorf estéril para o teste de citotoxicidade.

A cepa de *E. coli* EDL933, pertencente a Coleção de bactérias da DIMI, foi usada como controle positivo e a cepa *E. coli* K12 DH5 α , como controle negativo. Alíquota de caldo Penassay não semeado foi utilizado como ensaio em branco e, no teste utilizando o extrato, alíquota da solução de sulfato de polimixina B também foi utilizada como ensaio branco.

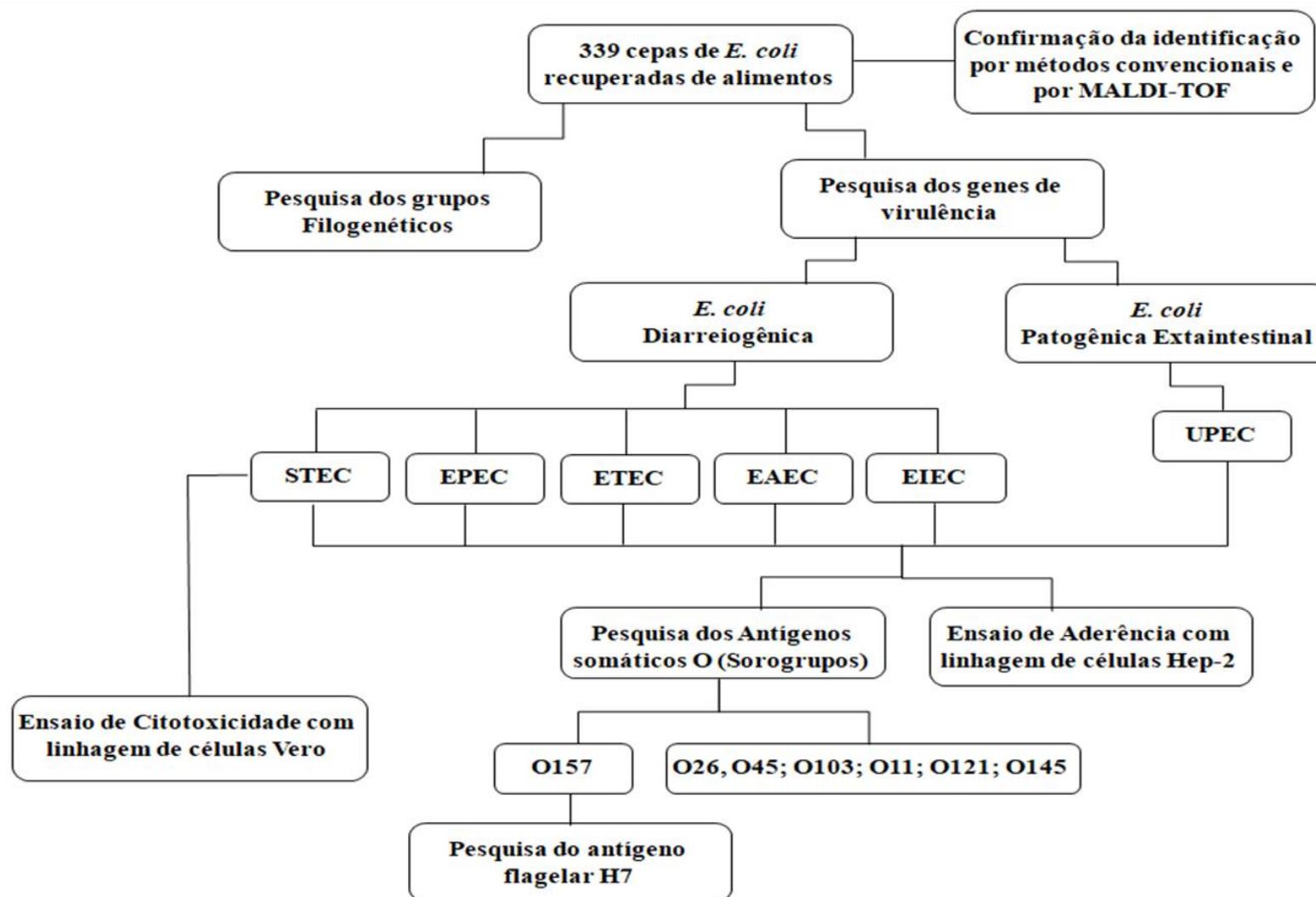
O teste de citotoxicidade foi conduzido com células Vero ATCC CCL 81, cultivadas em frascos plásticos (25cm² de área útil) em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Sigma), suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen) e com gentamicina (50 μ g/mL) e fungizona (2,5 μ g/mL). Após tratamento com solução tripsina-EDTA, a suspensão celular foi diluída a 1:10 (V/V) em meio completo (MEM suplementado com 5% de SFB inativado e com antimicrobianos) e volumes de 200 microlitros foram distribuídos nos 96 poços de fundo plano de placa de titulação para cultura de tecidos. As placas foram incubadas em atmosfera modificada enriquecida com 5% de CO₂ a 37°C por 24 a 48 horas, até o tapete celular atingir a confluência.

A execução do teste de citotoxicidade seguiu a metodologia proposta por Willshaw et al. (1985), na qual diluições 1:10 e 1:20 de cada filtrado (ou extrato) foram preparadas nos poços da placa, em duplicata. A placa de titulação foi agitada suavemente com movimentos circulares e incubadas a 37°C em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂, por 48 horas. Após incubação, as placas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido IMT-2 (Olympus), com objetivo de comparar os poços preparados com os controles positivo e negativo. O efeito citotóxico em 48 horas foi considerado caso fosse observada morte celular e desprendimento parcial ou total do tapete celular, sendo, então, sugestivo da produção da toxina de Shiga.

Uma vez realizada a leitura no microscópio invertido, a placa foi esvaziada por inversão rápida e os poços foram lavados com solução salina 0,85%. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as células no fundo dos poços, foram fixadas com metanol absoluto por 10 minutos e, posteriormente, coradas com solução de Giemsa (1:30, em tampão fosfato pH 6,5), por 10 a 12 horas, sob refrigeração. Após coloração, a placa foi esvaziada e lavada três a cinco vezes com água destilada para a retirada do corante. A observação dos poços foi feita visualmente. Onde a coloração foi inexistente, considerou-se ter havido morte celular pela ação da toxina.

O fluxograma a seguir (Figura 2) descreve, resumidamente, a sequência de experimentos adotada para a realização deste estudo.

Figura 2 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas



Fonte: A autora

3 RESULTADOS

3.1 Identificação das cepas

Entre as 339 cepas de *E. coli* incluídas no estudo, 70,8% (n=240) já haviam sido identificadas em trabalhos anteriormente conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório e encontravam-se estocadas em Skim Milk glicerol (10%). As cepas de *E. coli* recuperadas de salsa (n=99) foram identificadas bioquimicamente por método convencional e confirmada pelo método de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

3.2 Determinação do grupo filogenético das cepas de *Escherichia coli*

Entre as cepas de *E. coli* isoladas das diferentes origens alimentares, verificou-se que aproximadamente metade (n=164/48,4%) pertenciam ao grupo filogenético A, seguido dos grupos B1, D e B2, contendo, respectivamente, 31,9% (n=108); 12,1% (n=41) e 7,7% (n=26) das cepas. Além disso, o grupo filogenético A foi o único encontrado em cepas oriundas de todas as origens alimentares estudadas (Tabela 1).

Em relação aos achados referentes as cepas recuperadas de amostras de salsa, a quase totalidade (n=91/ 91,9%) foi classificada como pertencente aos grupos filogenéticos A (n=46/46,5%) e B1 (n=45/45,4%). Quando observado separadamente as bactérias isoladas das amostras *In natura* e minimamente processada, os grupos filogenéticos A e B1 foram os mais frequentes, respectivamente. Vale ressaltar que o grupo filogenético B2 não foi encontrado nas *E. coli* isoladas de amostras *In natura*.

Os resultados encontrados entre as amostras isoladas de frango, independente do tipo, revelaram que a maioria das cepas pertenciam aos grupos filogenéticos A e D (n=46/79,3%) e nenhuma cepa foi classificada no grupo filogenético B2. Ao avaliar os diferentes tipos de amostras de frango, percebeu-se que para amostras de frango orgânico o grupo filogenético mais frequente foi A, para as do tipo exportação foi o grupo D e nas amostras de frango tradicional, os grupos A e D.

Tabela 1: Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Escherichia coli* de acordo com a origem de isolamento

Grupo Filogenético	Salsa (n=99)		Frango (n=58)			Frutos do mar (n=160)							Alimento misto pronto para consumo Purê de batatas (dieta hospitalar) (n=9)	Leite pasteurizado (n=13)	Total por grupo filogenético (n=339)	%	
	<i>in natura</i> (n=44)	Minimamente processada (n=55)	Orgânico (n=26)	Tipo Exportação (n=17)	Tradicional (n=15)	Mariscos			Mexilhão								
						Chumbinho (n=9)	Sururu (n=10)	Siri catado (n=1)	Camarão (n=7)	Ostra (n=64)	<i>in natura</i> (n=31)	<i>in natura</i> Aferventado (n=7)					Comercial (n=31)
A	26	20	13	5	6	9	8	1	5	35	3	0	11	9	13	164	48,4%
B1	15	30	8	2	2	0	1	0	2	13	18	5	12	0	0	108	31,9%
D	3	3	5	10	7	0	1	0	0	5	5	1	1	0	0	41	12,1%
B2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	11	5	1	7	0	0	26	7,7%

Fonte: A autora

Entre as cepas de *E. coli* recuperadas de frutos do mar, independente da origem, os maiores percentuais 45% (n=72) e 31,8% (n=51) foram identificados para os grupos filogenéticos A e B1, respectivamente. Estratificando as amostras de frutos do mar, a maior parte das cepas isoladas das amostras de chumbinho, sururu, siri catado, camarão e ostras foram classificadas no grupo filogenético A. Entretanto, o grupo filogenético B1 foi o mais frequentemente encontrado entre as bactérias recuperadas de amostras de mexilhão.

Com relação às cepas de *E. coli* recuperadas do leite pasteurizado e do alimento pronto para consumo purê de batatas (dieta hospitalar), todas apresentaram pesquisa negativa para o gene *chuA* e para o fragmento *TspE4.C2* e foram classificadas no grupo filogenético A.

3.3 Pesquisa de marcadores moleculares de virulência de associados à *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) e patogênica extraintestinal (ExPEC) entre as cepas de *E. coli* isoladas de diferentes origens alimentares

Foram encontrados marcadores de virulência em 32,7% (n=111) das cepas de *E. coli* recuperadas de alimentos (n=339). De acordo com os marcadores moleculares encontrados, foi possível dividir as cepas em 29 perfis de virulência diferentes (Tabela 2). Entre os quais, o gene *stx2*, isoladamente, foi o mais prevalente, presente em 27% das cepas (n=30), caracterizando-as como STEC. Considerando perfis com mais de um gene de virulência, foi observado que 39,6% (n=44) das cepas eram STEC, por apresentarem *stx2* em seus perfis.

Vale ressaltar que nenhuma cepa apresentou marcadores para os patótipos diarreiogênicos ETEC, EIEC e EAEC e que apenas uma cepa apresentou perfil molecular para EPEC típica, isto é, a presença dos genes *eae* e *bfpA*, simultaneamente (Tabela 2).

A Tabela 2 mostra que o grupo filogenético A (n=62) foi o mais frequente entre as cepas que apresentaram algum marcador molecular de virulência, seguido pelo grupo filogenético D (n=30) e que o grupo filogenético B2 (n=7) foi o menos encontrado.

De acordo com a distribuição dos marcadores, observou-se que cepas albergando genes associados às ExPEC (n=60) foi mais prevalente do às DEC (n=30) e, além disso, 19% das cepas de *E. coli* apresentaram marcadores relacionados a ambas as categorias (n=21). Na Tabela 3, estão descritos, por cepa, os perfis de virulência encontrados associados às DEC ou às ExPEC ou ambas, considerando os grupo filogenético.

Tabela 2: Frequência dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* por perfil de virulência

	Perfis de Virulência	Origem	Grupo Filogenético				Total de amostras por perfil
			A	B1	B2	D	
1	<i>fimH</i>	Salsa (n=6)	4	-	-	2	6
		Salsa (n=3)	1	2	-	-	
		Frango (n=3)	3	-	-	-	
2	<i>stx2</i>	Frutos do mar (n=11)	10	1	-	-	30
		Purê de batatas (n=8)	8	-	-	-	
		Leite pasteurizado (n=5)	5	-	-	-	
3	<i>aer</i>	Frango (n= 4)	-	2	-	2	7
		Frutos do mar (n=3)	2	-	1	-	
4	<i>hlyA</i>	Frango (n=2)	2	-	-	-	4
		Leite pasteurizado (n=2)	2	-	-	-	
5	<i>traT</i>	Frango (n=2)	1	1	-	-	2
6	<i>afa</i>	Frutos do mar (n=8)	5	-	-	3	8
7	<i>cnf1</i>	Frutos do mar (n=1)	-	1	-	-	1
8	<i>flu</i> (AG43)	Frutos do mar (n=6)	1	1	3	1	8
		Leite pasteurizado (n=2)	2	-	-	-	
9	<i>stx2/fimH</i>	Salsa (n=4)	3	-	-	1	4
10	<i>aer/hlyA</i>	Frango (n=3)	2	-	-	1	3
11	<i>stx2/aer</i>	Frango (n=3)	2	-	-	1	3
12	<i>eae/aer</i>	Frango (n=1)	1	-	-	-	1
13	<i>traT/aer</i>	Frango (n=10)	1	2	-	7	10
14	<i>afa/flu</i> (AG43)	Frutos do mar (n=1)	1	-	-	-	1
15	<i>stx2/fimH/hlyA</i>	Salsa (n=2)	2	-	-	-	2
16	<i>stx2/traT/aer</i>	Frango (n=3)	1	2	-	-	3
17	<i>eae/traT/aer</i>	Frango (n=2)	1	-	-	1	2
18	<i>aer/papEF/papG</i>	Frango (n=2)	-	-	-	2	2
19	<i>traT/aer/hlyA</i>	Frango (n=2)	-	-	-	2	2
20	<i>traT/hlyA/afa</i>	Frango (n=1)	1	-	-	-	1
21	<i>eae/aer/hlyA</i>	Frango (n=2)	-	-	-	2	2
22	<i>aer/papEF/afa</i>	Frutos do mar (n=1)	-	-	-	1	1
23	<i>eae/bfpA/aer</i>	Frango (n=1)	1	-	-	-	1
24	<i>papEF/papG/flu</i> (AG43)	Frutos do mar (n=1)	-	-	1	-	1
25	<i>stx2/traT/aer/hlyA</i>	Frango (n=2)	-	-	-	2	2
26	<i>eae/aer/papEF/papG</i>	Frango (n=1)	-	-	-	1	1
27	<i>aer/papEF/papG/flu</i> (AG43)	Frutos do mar (n=1)	-	-	1	-	1
28	<i>papEF/papG/flu</i> (AG43)/ <i>cnf1</i>	Frutos do mar (n=1)	-	-	1	-	1
29	<i>traT/aer/hlyA/papEF/papG</i>	Frango (n=1)	-	-	-	1	1
		Total	62	12	7	30	111

Fonte: A autora

Tabela 3: Caracterização molecular de virulência de *Escherichia coli* por amostra e origem

Origem	Amostra	Origem	Grupo Filogenético	Perfil de Virulência	Marcadores relacionados à DEC / ExpEC
Salsa	33i	<i>in natura</i>	A	<i>fimH</i>	ExpEC
	38i	<i>in natura</i>	D	<i>fimH</i>	ExpEC
	39i	<i>in natura</i>	A	<i>fimH</i>	ExpEC
	40i	<i>in natura</i>	A	<i>fimH</i>	ExpEC
	41i	<i>in natura</i>	A	<i>fimH</i>	ExpEC
	16MP	Min. Processada	D	<i>fimH</i>	ExpEC
	27MP	Min. Processada	B1	<i>stx2</i>	DEC
	28MP	Min. Processada	B1	<i>stx2</i>	DEC
	34MP	Min. Processada	A	<i>stx2</i>	DEC
	31i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC
	32i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC
	34i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC
	37i	<i>in natura</i>	D	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC
	35i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH/hlyA</i>	DEC / ExpEC
	36i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH/hlyA</i>	DEC / ExpEC
Frango	FG33	Orgânico	D	<i>aer</i>	ExpEC
	FG48	Orgânico	B1	<i>aer</i>	ExpEC
	FG51	Orgânico	D	<i>aer</i>	ExpEC
	FG57	Tipo Exportação	B1	<i>aer</i>	ExpEC
	FG17	Tradicional	A	<i>stx2</i>	DEC
	FG18	Tradicional	A	<i>stx2</i>	DEC
	FG20	Orgânico	A	<i>stx2</i>	DEC
	FG35	Orgânico	A	<i>hlyA</i>	ExpEC
	FG36	Orgânico	A	<i>hlyA</i>	ExpEC
	FG39	Orgânico	B1	<i>traT</i>	ExpEC
	FG49	Orgânico	A	<i>traT</i>	ExpEC
	FG16	Tradicional	A	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC
	FG38	Orgânico	A	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC
	FG46	Orgânico	D	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC
	FG8	Tipo Exportação	A	<i>stx2/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG9	Tipo Exportação	A	<i>stx2/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG13	Tipo Exportação	D	<i>stx2/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG26	Tradicional	A	<i>eae/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG3	Tradicional	B1	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG4	Tradicional	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG5	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG6	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG7	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG22	Orgânico	B1	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG29	Tradicional	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG30	Tradicional	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG42	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG50	Orgânico	A	<i>traT/aer</i>	ExpEC
	FG31	Tradicional	D	<i>traT/aer / hlyA</i>	ExpEC
	FG1	Orgânico	B1	<i>stx2/traT/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG2	Orgânico	B1	<i>stx2/traT/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG12	Tipo Exportação	A	<i>stx2/traT/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG53	Tipo Exportação	D	<i>eae / aer / hlyA</i>	DEC / ExpEC
	FG24	Tradicional	D	<i>eae/traT/aer</i>	DEC / ExpEC
	FG25	Tradicional	A	<i>eae/traT/aer</i>	DEC / ExpEC
FG28	Tradicional	D	<i>aer/papEF/papG</i>	ExpEC	
FG43	Tipo Exportação	D	<i>aer/papEF/papG</i>	ExpEC	
FG37	Orgânico	D	<i>traT/aer/hlyA</i>	ExpEC	
FG40	Orgânico	A	<i>traT/hlyA/afa</i>	ExpEC	
FG47	Orgânico	D	<i>eae/aer/hlyA</i>	DEC / ExpEC	
FG54	Tipo Exportação	A	<i>eae/bfpA/aer</i>	DEC / ExpEC	
FG14	Tipo Exportação	D	<i>stx2/traT/aer/hlyA</i>	DEC / ExpEC	
FG15	Tipo Exportação	D	<i>stx2/traT/aer/hlyA</i>	DEC / ExpEC	
FG55	Tipo Exportação	D	<i>eae/aer/papEF/papG</i>	DEC / ExpEC	
FG32	Tradicional	D	<i>traT/aer/hlyA/papEF/papG</i>	ExpEC	

Tabela 3 (Continuação)

Origem	Amostra	Origem	Grupo Filogenético	Perfil de Virulência	Marcadores relacionados à DEC / ExpEC
	FM16	Sururu	A	<i>aer</i>	ExpEC
	FM71	Ostra	A	<i>aer</i>	ExpEC
	FM79	Ostra	B2	<i>aer</i>	ExpEC
	FM35	Ostra	A	<i>stx2</i>	DEC
	FM36	Ostra	A	<i>stx2</i>	DEC
	FM39	Ostra	B1	<i>stx2</i>	DEC
	FM82	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC
	FM87	Ostra	D	<i>afa</i>	ExpEC
	FM88	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC
	FM89	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC
	FM90	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC
	MX12	Aferventado	D	<i>afa</i>	ExpEC
	MX18	<i>in natura</i>	D	<i>afa</i>	ExpEC
	MX19	<i>in natura</i>	A	<i>afa</i>	ExpEC
	MX21	<i>in natura</i>	B1	<i>cnf1</i>	ExpEC
Frutos do mar	MX31	Comercializado	D	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX32	Comercializado	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX46	<i>in natura</i>	B2	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX47	<i>in natura</i>	B2	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX54	Comercializado	B1	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX62	<i>in natura</i>	B2	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX22	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX23	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX24	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX25	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX27	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX28	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX29	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX30	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
	MX17	<i>in natura</i>	A	<i>afa/flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX16	<i>in natura</i>	D	<i>aer/papEF/afa</i>	ExpEC
	MX26	Comercializado	B2	<i>papEF/papG/flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX59	<i>in natura</i>	B2	<i>aer/papEF/papG/flu (AG43)</i>	ExpEC
	MX49	Comercializado	B2	<i>papEF/papG/flu (AG43)/cnf1</i>	ExpEC
Purê de batatas	PB1	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB2	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB3	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB4	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB6	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB7	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB8	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	PB9	Dieta hospitalar	A	<i>stx2</i>	DEC
	Leite Pasteurizado	LP1	Comercializado	A	<i>stx2</i>
LP2		Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
LP3		Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
LP4		Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
LP5		Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC
LP6		Comercializado	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
LP12		Comercializado	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC
LP7		Comercializado	A	<i>hlyA</i>	ExpEC
LP11		Comercializado	A	<i>hlyA</i>	ExpEC

Fonte: A autora

Entre as amostras isoladas de salsa, observou-se que apenas 15,1% (n=15) do total de cepas apresentou perfil de virulência, demonstrando uma baixa frequência destes marcadores,

nesta origem. Importante destacar que a frequência dos genes de virulência foi maior nas cepas provenientes de salsa *in natura* do que nas amostras minimamente processadas. Nas cepas de *E. coli* recuperadas de salsa, os marcadores moleculares associados à ExPEC foram mais frequentes do que os à DEC, uma vez que seis cepas apresentaram exclusivamente marcadores para ExPEC, sendo cinco provenientes de salsa *in natura* e outras seis cepas continham, simultaneamente, marcadores para DEC e ExPEC.

Os genes encontrados entre as cepas com marcadores de virulência em amostras de salsa foram o *fimH*, uma adesina fimbrial tipo I, associada à patogênese de UPEC. Estes isolados pertenciam aos grupos filogenéticos A e D e estavam presentes tanto em amostras *in natura* quanto nas minimamente processadas. O gene *stx2*, referente à produção da toxina de Shiga, também foi encontrado, em cepas classificadas nos grupos filogenéticos A e B1. Vale ressaltar que, isoladamente, este marcador foi encontrado apenas nas amostras minimamente processadas.

Outro perfil encontrado foi a associação dos genes *fimH* e *stx2*, em cepas isoladas de amostras *in natura*, classificadas nos grupos filogenéticos A e D. Outro marcador presente foi o *hlyA*, da hemolisina A, uma exotoxina que provoca lesão na membrana das células sanguíneas, levando à hemólise, em associação à *fimH* e *stx2*, em cepas oriundas de amostras *in natura*, do filogrupo A. Importante mencionar que as cepas 47MP e 51MP, ambas do grupo filogenético B2, não apresentaram nenhum dos marcadores de virulência estudados.

Nas cepas isoladas de amostras de frango, foi observada maior frequência de marcadores de virulência entre todas as origens estudadas. Em 77,6% das cepas (n=45) foi encontrado perfil de virulência. Destas, 6,7% (n=3) continham apenas marcadores de DEC; isto é, apenas o gene *stx2*. Das cepas, 33,3% (n=15) continham marcadores relacionados à DEC e ExPEC simultaneamente e, a maioria, 60% (n=27) apenas genes associados à ExPEC.

As *E. coli* recuperadas das amostras de frango, foram as que apresentaram maior diversidade de perfis de virulência, tendo sido identificados 20 perfis distintos. Entre os genes presentes estavam: *eae*, *bfpA*, *stx2*, *aer*, *hlyA*, *traT*, *papEF*, *papG*. Independente da origem, amostras de frango tradicional, orgânico ou tipo exportação, o gene *aer* foi o mais prevalente, estando presente em 82,2% (n=37) das cepas, isoladamente ou associado a outros marcadores; seguido pelo gene *traT*, encontrado em 51,1% (n=23) das bactérias estudadas, isoladamente ou em associação a outros marcadores.

A cepa FG54, proveniente de frango tipo exportação, merece destaque, pois, apresentou os genes *eae* e *bfpA*, característicos de tEPEC, simultaneamente. Outra cepa que merece atenção é a FG32, isolada de amostra de frango tradicional. Esta foi classificada no

grupo filogenético D e apresentou, simultaneamente, cinco genes de virulência, todos característicos de ExPEC, sendo a cepa com o maior número de marcadores de virulência entre todos os estudados.

Uma baixa frequência de marcadores de virulência foi observada nas *E. coli* isoladas de frutos do mar, da região da Bahia. Apenas 12,1% (n=11) das cepas apresentaram perfil de virulência, das quais 90,1% (n=10) eram provenientes de amostras de ostra. Vale ressaltar que em 72,7% (n=8) das cepas com perfil de virulência, foi observado exclusivamente marcadores associados à ExPEC, como *aer* e *afa* e estavam relacionadas aos grupos filogenéticos A, B2 e D. As demais cepas (n=3) que apresentaram marcadores moleculares de DEC continham apenas o gene *stx2* e eram pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1, mais comumente associados a cepas comensais.

Das 69 cepas isoladas de mexilhões, 33,3% (n=23), pertencentes a todos os grupos filogenéticos, apresentaram marcador de virulência. Entre elas, em 65,2% (n=15) foram encontrados apenas marcadores moleculares para ExPEC, dos quais Ag43 (*flu*) e *afa*, isoladamente e associado a outros genes, foram os mais frequentes, 43,5% (n=10) e 21,7% (n=5), respectivamente. Vale ressaltar que esta origem alimentar foi a única a revelar cepas contendo o gene *cnf-1*.

Entre os perfis de virulência das cepas isoladas de mexilhões, 34,8% (n=8) eram STEC, por apresentarem o gene *stx2*, nestes casos, como único marcador. Todas essas cepas foram provenientes de amostras de mexilhões comercializados em Niterói (RJ) e pertenciam ao grupo filogenético A.

As cepas isoladas de leite pasteurizado apresentaram alta frequência de marcadores de virulência (69,2%). O perfil mais prevalente foi o gene *stx2*, isoladamente, em 55,6% (n=5) das cepas. Também foram encontradas cepas com marcadores moleculares associados à ExPEC, a saber: AG43 e *hlyA*.

As cepas de *E. coli* isoladas de amostras de purê de batatas, oriundo da dieta hospitalar, apresentaram a frequência mais elevada de marcadores de virulência, entre as diversas origens alimentares, considerando que o percentual de amostras positivas foi de 88,9% (n=8). No entanto, foi a origem cuja variedade de perfis foi a menos diversificada. Todas as cepas continham, apenas, o gene *stx2*, isoladamente, sendo caracterizadas com STEC. Vale ressaltar que todas as cepas pertenciam ao grupo filogenético A e que não foram identificados genes de ExPEC em nenhuma *E. coli* isolada deste alimento.

3.4 Determinação dos sorogrupos de *Escherichia coli* O157 e não-O157 (“Big Six”)

As cepas que apresentaram perfil de virulência foram submetidas à pesquisa dos principais sorogrupos, o O157 e não O-157, envolvidos com doença diarreica no mundo. Entre as cepas analisadas, apenas 20,7% (n=23) pertenciam aos sorogrupos verificados. Entre os sorogrupos não-O157, apenas O121, O103 e O145 foram encontrados, em cepas recuperadas de salsa, frango e mexilhões, respectivamente.

Faz-se necessário ressaltar os resultados encontrados nas *E. coli* isoladas de purê de batatas da dieta hospitalar, onde 87,5% (n=7) das cepas, que eram STEC, por albergar o gene *stx2*, foram sorogrupadas como O157 (Tabela 4).

Tabela 4: Cepas sorogrupadas discriminadas por diferentes origens e perfil de virulência para *Escherichia coli* diarreio gênica e/ou *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

Origem	Amostra	Grupo Filogenético	Sorogrupo	Perfil Marcadores de Virulência	Marcadores relacionados à DEC / ExpEC
Salsa <i>In natura</i>	35i	A	O121	<i>stx2/fimH/hlyA</i>	DEC / ExpEC
Salsa <i>In natura</i>	36i	A	O121	<i>stx2/fimH/hlyA</i>	DEC / ExpEC
Frango Orgânico	FG48	B1	O103	<i>aer</i>	ExpEC
Frango Orgânico	FG46	D	O103	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC
Frango Tipo Exportação	FG8	A	O103	<i>stx2/aer</i>	DEC / ExpEC
Frango Tipo Exportação	FG9	A	O103	<i>stx2/aer</i>	DEC / ExpEC
Frango Tipo Exportação	FG43	D	O103	<i>aer/papEF/papG</i>	ExpEC
Frutos do mar	MX21	B1	O145	<i>cnf1</i>	ExpEC
Frutos do mar	MX22	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX23	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX24	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX25	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX27	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX28	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX29	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Frutos do mar	MX30	A	O145	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB2	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB3	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB4	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB6	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB7	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB8	A	O157	<i>stx2</i>	DEC
Purê de batatas	PB9	A	O157	<i>stx2</i>	DEC

Fonte: A autora

3.5 Pesquisa do Antígeno flagelar H7 nas cepas de *Escherichia coli* pertencentes ao sorogrupo O157

As cepas de *E. coli* identificadas como pertencentes ao sorogrupo O157, recuperadas de amostras de purê de batata, foram submetidas à pesquisa do antígeno flagelar H7. No entanto, nenhuma das amostras avaliadas (n=7) apresentou o referido antígeno. Desta forma, as cepas recuperadas da dieta hospitalar não pertenciam ao sorotipo O157:H7, que é um dos mais envolvidos em doenças de origem alimentar.

3.6 Determinação dos fenótipos de aderência com células Hep-2

Todas as cepas que apresentaram marcador de virulência (n=111) foram submetidas ao ensaio para determinação do fenótipo de aderência com células Hep-2. Em 35,1% (n=39) das cepas submetidas ao ensaio foram observados algum perfil de aderência, tais como aderência agregativa (AA), aderência difusa (AD), aderência localizada *like* (LA *Like*) e aderência agregativa ao vidro (AA vidro).

Entre as cepas recuperadas dos diferentes alimentos, foi possível observar que 46,2% (n=6) das *E. coli* isoladas de leite pasteurizado apresentaram padrões de aderência, seguido por 24,1% (n=14) das cepas isoladas de frango, 8,1% (n=13) das isoladas de frutos do mar e 6,1% (n=6) das cepas provenientes de salsa *In natura* e minimamente processada.

Nas cepas recuperadas de amostras de salsa foi possível observar os fenótipos de aderência agregativa, aderência difusa e aderência agregativa ao vidro, associados aos marcadores de virulência *stx2* e *fimH* isolados ou em associação e que as cepas eram pertencentes aos grupos filogenéticos A, B1 e D.

Entre as *E. coli* recuperadas de amostras de frango, os mesmos três fenótipos, aderência agregativa, aderência difusa e aderência agregativa ao vidro, também foram encontrados, porém os marcadores de virulência mais frequentes foram *traT* e *aer*, isoladamente ou em associação e além dos grupos filogenéticos A e D. A cepa FG54, proveniente de frango tipo exportação, merece destaque, pois, apesar de apresentar os genes *eae* e *bfpA*, característicos de tEPEC, não apresentou AL nos ensaios de aderência à célula HEp-2, em 3 ou 6 horas.

Entre as amostras de frutos do mar, as cepas recuperadas de ostras e sururu apresentaram padrões de aderência agregativa e difusa, associados aos marcadores de virulência *stx2*, *aer* e *afa* isoladamente e pertenciam aos filogrupos A e B1. Enquanto que nas cepas provenientes das amostras de mexilhões, além dos dois fenótipos já citados, também observou-se o padrão de aderência Localizada *Like*, associado a marcadores como *stx2*, *afa* e *flu*. Essas cepas pertenciam aos grupos filogenéticos A, B2 e D.

Com relação às cepas isoladas das amostras de leite pasteurizado o fenótipo de aderência agregativa foi o mais frequente e estava associado aos marcadores *stx2* e *flu* e todas pertenciam ao grupo filogenético A. Apenas uma cepa apresentou o fenótipo de aderência ao vidro. Vale ressaltar que nenhuma cepa de *E. coli* recuperada das amostras de purê de batatas apresentou fenótipo de aderência, conforme apresentado na Tabela 5, a seguir.

Além disso, duas cepas recuperadas de amostra de frango (FG46 e FG48) e uma de mexilhão (MX30) merecem destaque uma vez que foram sorogrupadas como O103 e O145, respectivamente. As *E. coli* FG46 e FG48, provenientes de amostras de frango, apresentaram padrão de aderência agregativa ao vidro, enquanto a MX30, recuperada de mexilhão, apresentou fenótipo agregativo à célula Hep-2.

Tabela 5: Fenótipos de Aderência entre as cepas de *Escherichia coli* apresentando um ou mais gene (s) de virulência

Origem	Amostr a	Origem	Grupo Filogenético	Perfil de Virulência	Marcadores relacionados à DEC/ExpEC	Padrão de aderência
Salsa	34i	<i>in natura</i>	A	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC	AA (vidro)
	37i	<i>in natura</i>	D	<i>stx2/fimH</i>	DEC / ExpEC	AA (vidro)
	38i	<i>in natura</i>	D	<i>fimH</i>	ExpEC	AD
	39i	<i>in natura</i>	A	<i>fimH</i>	ExpEC	AA
	27MP	Min. Processada	B1	<i>stx2</i>	DEC	AA
	28MP	Min. Processada	B1	<i>stx2</i>	DEC	AA
Frango	FG4	Tradicional	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG5	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC	AA
	FG6	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG7	Tipo Exportação	D	<i>traT/aer</i>	ExpEC	AA
	FG16	Tradicional	A	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG22	Orgânico	B1	<i>traT/aer</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG28	Tradicional	D	<i>aer/papEF/papG</i>	ExpEC	AA
	FG33	Orgânico	D	<i>aer</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG46	Orgânico	D	<i>aer/hlyA</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG47	Orgânico	D	<i>eae/aer/hlyA</i>	DEC / ExpEC	AD
	FG48	Orgânico	B1	<i>aer</i>	ExpEC	AA (vidro)
	FG49	Orgânico	A	<i>traT</i>	ExpEC	AD
	FG53	Tipo Exportação	D	<i>eae / aer / hlyA</i>	DEC / ExpEC	AA (vidro)
	FG55	Tipo Exportação	D	<i>eae/aer/papEF/papG</i>	DEC / ExpEC	AA (vidro)

Tabela 5 (continuação)

Frutos do mar	FM16	Sururu	A	<i>aer</i>	ExpEC	AA
	FM36	Ostra	A	<i>stx2</i>	DEC	AD
	FM39	Ostra	B1	<i>stx2</i>	DEC	AA
	FM71	Ostra	A	<i>aer</i>	ExpEC	AD
	FM82	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC	AA
	FM88	Ostra	A	<i>afa</i>	ExpEC	AA
	MX16	<i>in natura</i>	D	<i>aer/papEF/afa</i>	ExpEC	AA
	MX18	<i>in natura</i>	D	<i>afa</i>	ExpEC	LA Like
	MX25	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC	LA Like
	MX27	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC	LA Like
	MX30	Comercializado	A	<i>stx2</i>	DEC	AA
	MX32	Comercializado	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC	LA Like
	MX49	Comercializado	B2	<i>papEF/papG/flu (AG43)/cnf1</i>	ExpEC	AD
Leite	LP2	Comércio	A	<i>stx2</i>	DEC	AA
	LP3	Comércio	A	<i>stx2</i>	DEC	AA (vidro)
	LP4	Comércio	A	<i>stx2</i>	DEC	AA
	LP5	Comércio	A	<i>stx2</i>	DEC	AA
	LP6	Comércio	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC	AA
	LP12	Comércio	A	<i>flu (AG43)</i>	ExpEC	AA

Legenda: Aderência Agregativa (AA); Aderência Agregativa ao vidro (AA vidro); Aderência Difusa (AD), Aderência Localizada Like (AL Like)

Fonte: A autora

3.7 Ensaio de citotoxicidade para Stx em cepas *Escherichia coli* utilizando a linhagem celular Vero

As cepas de *E. coli* identificadas como STEC, recuperadas de todas as origens alimentares, foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade com células Vero pelo processo convencional de obtenção de filtrado e pelo método alternativo de extração pelo sulfato de polimixina. Em ambos os ensaios, nenhuma das 44 cepas testadas apresentaram efeito citotóxico em 48 horas, isso é, morte celular e desprendimento parcial ou total do tapete celular, sugerindo a não expressão de STX.

4 DISCUSSÃO

E. coli, além de ser uma bactéria pertencente à microbiota intestinal humana, é um importante patógeno de origem alimentar. Estudos vêm demonstrando a presença deste patógeno em diferentes origens, como produtos alimentícios, amostras humanas, animais e ambiente (CALLEJÓN et al., 2015; NTULI, NJAGE & BUYS, 2017; AIJUKA & BUYS, 2019; GHITA et al., 2020).

Cerca de 80% das cepas de *E. coli* avaliadas neste estudo pertencem aos grupos A e B1, grupos filogenéticos geralmente relacionados a cepas comensais humanas e de animais (MADOSHI et al., 2016; STOPPE et al., 2017). O único grupo filogenético presente em todas as origens alimentares estudadas foi o A. Desta forma, a frequência dos referidos filogrupos no conjunto de amostras pode estar associada à contaminação de origem fecal (CLERMONT et al., 2000; JOHNSON et al., 2008; WOOD et al., 2015).

A alta prevalência de cepas de *E. coli* recuperadas de alimentos, pertencendo ao grupo filogenético B1 vem sendo relatada em alguns estudos (DOLEZALOVA e HOLKO, 2015; LE et al., 2015; PAVLICKOVA, DOLEZALOVA e HOLKO, 2015; OLIVEIRA et al., 2020). Scheinberg et al. (2017) ao pesquisar grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* isoladas de amostras de alimentos de diferentes origens, tais como carne bovina e suína e vegetais folhosos, obtidos em mercados na Pensilvânia (EUA) revelaram que o grupo B1 foi o mais frequente nas cepas provenientes de amostras de origem animal, enquanto nas de origem vegetal, foi o grupo B2, seguido de B1.

Cepas de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B1 já foram recuperadas de uma ampla variedade de fontes, como seres humanos, gado, ambientes naturais (CARLOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2018). Devido a sua elevada adaptabilidade aos diferentes ambientes, a utilização de cepas do grupo B1 como indicadores de contaminação fecal humana pode não ser muito apropriada (WOOD et al., 2015).

Muitos estudos têm relatado a presença de *E. coli* em vegetais folhosos (WOOD 2015; CALEJÓN et al, 2015; MOGREN et al, 2018; KINTZ et al. , 2019; LUNA-GUEVARA et al., 2019; MACHADO-MOREIRA et al., 2019). No presente trabalho, a quase totalidade das cepas recuperadas de amostras de salsa pertenciam aos grupos A e B1. Resultados semelhantes foram observados em amostras originárias de vegetais folhosos adquiridas de mercados na Pensilvânia (EUA) (SCHEINBERG et al., 2017) e em amostras de água de irrigação e em hortaliças de fazendas no norte de Portugal (ARAÚJO et al., 2017).

Entre as bactérias isoladas de amostras de salsa, o grupo filogenético B2 só foi observado nas provenientes de alimentos minimamente processados, resultados semelhantes ao trabalho de Wood *et al.* (2015). Adicionalmente, o grupo A foi o mais frequente nas amostras *In natura*. Isso pode estar relacionado tanto a uma possível utilização da água de irrigação contaminada por fezes (ARAÚJO *et al.*, 2017) quanto à possível utilização de fezes de animais na adubação (JOHNSON *et al.*, 2008; CARLOS *et al.*, 2010; WOOD *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2018). A possível contaminação de vegetais folhosos durante a colheita merece atenção e poderia ser minimizada com a adoção da prática de higienização das mãos com água e sabão e uso de antiséptico à base de álcool (PRINCE-GUERRA *et al.*, 2020).

O fato de o grupo B1 ter sido o mais encontrado entre as amostras de salsa minimamente processada pode estar ligado à exposição deste alimento a diferentes superfícies, durante o processamento mínimo, uma vez que, de acordo com Wood e colaboradores (2015), as cepas pertencente ao grupo filogenético B1 apresentam elevada adaptabilidade aos diferentes ambientes.

Os grupos filogenéticos A e D foram os mais frequentes entre as cepas de *E. coli* recuperadas de amostras de frango, no presente trabalho. Pavlickova *et al.* (2015), estudando virulência de *E. coli* em carne de frango na República Tcheca, verificaram que mais da metade pertenciam ao grupo filogenético A, seguido de B1, sugerindo que as cepas eram de origem comensal. Os autores encontraram cepas pertencentes ao grupo B2, principalmente associada à doença extraintestinal em humanos (CLERMORNT *et al.*, 2008) nas amostras de frango, diferentemente dos nossos achados.

Outro estudo, conduzido por Koga *et al.* (2015), analisando cepas de *E. coli* isoladas de carcaças de frango comercializados no Paraná, Brasil, encontrou os grupos filogenéticos D e B1 entre os mais prevalentes e, assim como os nossos achados, uma baixa frequência de cepas classificadas como pertencentes ao grupo B2. Para os autores, isso indica que a principal fonte de contaminação das carcaças de frango ocorrem com bactérias comensais, uma vez que a maioria das cepas de ExPEC estão incluídas no grupo filogenético B2 (CLERMONT *et al.*, 2000).

A colibacilose, infecção causada por *Escherichia coli*, é considerada uma das principais doenças na avicultura industrial, acarretando perdas econômicas elevadas. Por esse motivo, na criação tradicional, o antimicrobiano é utilizado como forma terapêutica, profilática e ainda como promotor de crescimento, podendo acarretar alteração na microbiota normal do animal (CASAGRANDE *et al.*, 2017; HUONG LUU *et al.*, 2021).

Entre as cepas de *E. coli* isoladas de amostras de frango orgânico, cuja produção contempla a utilização de ração composta por vegetais de cultivo orgânico e grãos não transgênicos e, diferentemente da criação tradicional, não utiliza antimicrobianos, o grupo filogenético A foi o mais frequente. Traçando um paralelo aos resultados obtidos nas amostras de salsa *In natura*, onde este filogrupo também foi o mais frequente, pode-se sugerir que esta alta frequência do grupo A esteja relacionada ao uso do adubo, utilizado para o cultivo orgânico dos vegetais, contendo fezes animais (JOHNSON et al., 2008; CARLOS et al., 2010; WOOD et al., 2015; FERREIRA et al., 2018) e também à água de irrigação (ARAÚJO et al., 2017).

O grupo filogenético D foi o mais prevalente entre as amostras de frango tipo exportação e tradicional. Estes achados estão em consonância com os resultados encontrados por Koga et al. (2015), onde o grupo D foi um dos mais encontrados entre os isolados, sugerindo que os isolados de amostras de frango tipo exportação e tradicional possam ser mais virulentas (CARLOS et al., 2010).

Entre as cepas recuperadas de frutos do mar, os grupos filogenéticos A, predominantes em humanos, e B1, geralmente oriundo de animais (Carlos et al., 2010; FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020); foram os mais frequentes tanto nas amostras provenientes da Bahia quanto nas de Niterói (RJ). A presença destes grupos filogenéticos está fortemente associada ao fato de os ambientes aquáticos costeiros poderem estar contaminados por resíduos de efluentes não tratados de humanos e animais (EDGE et al., 2012).

Um estudo conduzido com ostras e mexilhões da região costeira do Oceano Atlântico, no Canadá, mostrou a predominância dos grupos filogenéticos A e D e ausência do grupo B2 em suas cepas (REES et al., 2015). Diferentemente, nosso trabalho revelou cepas pertencentes ao grupo B2 nas amostras de ostras provenientes da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos (BA) e mexilhões da região costeira de Niterói (RJ), sugerindo que esses alimentos estejam albergando cepas de ExPEC com potencial patogênico em humanos.

Freitas et al. (2017) demonstraram que a água de viveiros de ostras da Baía de Todos os Santos (BA) apresentou boa qualidade microbiológica. No entanto, a densidade de coliformes termotolerantes aumentava significativamente em períodos chuvosos. Resultado semelhante foi observado nas águas das praias de Niterói (RJ), onde foi verificado que a presença de detritos é influenciada pela ação antropogênica, pela contaminação dos rios que desaguam nas praias após períodos chuvosos e pela localização geográfica que favorece o acúmulo de detritos e resíduos (SILVA et al., 2016).

Todas as cepas recuperadas de amostras de leite pasteurizado foram classificadas no grupo filogenético A. Este grupo está mais relacionado às cepas comensais de humanos (CARLOS et al, 2010). Entretanto, a presença de *E. coli* pertencente a este filogrupos já foi previamente descrita no Brasil, com amostras de leite cru e queijo minas frescal, provenientes dos estados do Paraná e Maranhão. No referido estudo, o grupo filogenético A foi encontrado em 63% (14/22) das cepas de *E. coli* isoladas dos alimentos (Ribeiro Júnio et al., 2019). É possível considerar que as referidas contaminações tenham sido originadas por falhas no processamento do leite, tais como falhas na pasteurização ou na cadeia de frio ou ainda contaminação pós tratamento térmico (CARNEIRO et al., 2006; KOUSHKI et al., 2016).

Não há relatos na literatura que investiguem grupos filogenéticos em cepas de *E. coli* isoladas de purê de batatas. Entretanto, os dados obtidos indicam uma provável contaminação pela manipulação e/ou processamento do alimento, uma vez que o grupo filogenético A está normalmente relacionado às cepas comensais humanas. Estudo anterior, conduzido pelo nosso grupo, já demonstrou contaminação de alguns equipamentos da mesma cozinha hospitalar, incluindo o liquidificador utilizado no preparo do purê de batatas, indicando a necessidade de melhorias nos procedimentos de higienização (MIYAHIRA et al., 2018 MIYAHIRA et al., 2013).

A pesquisa mostrou que mais da metade das cepas que albergavam algum perfil de virulência pertenciam ao grupo filogenético A, pouco relacionado à presença de marcadores de virulência e frequentemente relacionado às cepas comensais. No entanto, considerando, a plasticidade genética das *E. coli* e a forte capacidade de compartilhar informações genéticas, é possível que linhagens pertencentes a estes grupos alberguem genes de virulência (CLERMONT et al., 2000, JOHNSON et al., 2008; LINDSTEDT et al., 2018), conforme descrito, recentemente, por Massella e colaboradores (2020) em cepas de *E. coli* isoladas de humanos, animais e alimentos, na Itália.

Este estudo avaliou a presença de genes de virulência para cinco patótipos de DEC. Somente os marcadores *stx₂*, *eae* e *bfpA*, foram encontrados no genótipo das cepas. Entre as bactérias estudadas que albergavam genes de virulência, aproximadamente, 40% pertenciam ao patótipo STEC por apresentar o *stx₂*, isoladamente ou associado a outros marcadores. Cepas STEC são frequentemente encontradas em animais, sendo o gado o principal reservatório e uma das mais importantes fontes de contaminação dos alimentos e água (CAPRIOLI, SCAVIA & MORABITO, 2014; TORO et al., 2018; TORRES et al., 2018;). A presença deste microrganismo em amostras alimentares representa um alerta, em virtude da

sua baixa dose infectante, ou seja, poucas células já são suficientes para desenvolver infecção (KARMALI, 2009).

Vale ressaltar que *stx*₂ estava presente nas cepas recuperadas de todas as diferentes fontes alimentares estudadas, sugerindo uma possível adaptação aos diferentes ambientes e superfícies de alimentos. Alguns estudos demonstraram que a aquisição/presença do gene *stx*₂ pode oferecer alguma vantagem seletiva para a *E. coli* em resposta a pressões ambientais (SCHMIDT, SHRING & BESSER, 2016), favorecendo sua persistência no ambiente agrícola e de produção de alimentos (AIJUKA & BUYS, 2019).

A presença de STEC nas diferentes matrizes alimentares pode ser justificada pela capacidade deste microrganismos em utilizar mecanismos de resistência ao estresse como estratégia de sobrevivência nos alimentos, as permitindo crescer condições diferentes das condições ótimas, como baixas temperaturas e baixo pH (GONZALEZ & CERQUEIRA, 2019).

O fato de todas as cepas caracterizadas como STEC albergarem apenas o marcador molecular *stx*₂ e não apresentarem o gene *stx*₁ merece destaque, uma vez que a patogenicidade para humanos, incluindo a evolução para casos mais graves, como a evolução para HUS são mais associadas às cepas com genótipo *stx*₂ (PATON & PATON, 1998; KAWANO et al., 2008; KARGAR & HOMAYOON, 2015; FERREIRA et al., 2018).

Embora os dados sobre STEC em alimentos no Brasil sejam escassos, o perfil genotípico das cepas indica o potencial patogênico desses microrganismos para os humanos. A capacidade de produzir a toxina Shiga é o principal fator de virulência relacionado a esse patotipo e a maioria das STEC isoladas de alimentos e água no país, alberga o gene *stx*₂ isoladamente. No entanto, nem toda cepa de STEC necessariamente implicará em casos de doença em humanos, estando relacionada a condição do hospedeiro. Vale ressaltar que a produção de Stx, por si, pode não ser suficiente para o desenvolvimento de sintomas, sendo então necessários outros fatores de virulência associados, principalmente à capacidade de adesão ao enterócito. (EFSA 2013; GOMES et al., 2016; GONZALEZ & CERQUEIRA, 2019).

Em cepas STEC LEE negativas; ou seja, que não albergam o gene *eae*, vem sendo caracterizada uma ilha de patogenicidade denominada *Locus of Adhesion and Autoaggregation* (LAA) que codifica vários fatores de virulência, incluindo a adesina autotransportadora AG43 (*flu*), sugerindo que, na ausência de LEE, LAA pode conferir um mecanismo de adesão alternativo ao enterócito (MONTERO et al., 2017; TORRES et al., 2018).

Entre as cepas estudadas, que carregavam marcadores de virulência, 73% albergavam marcadores associados à ExPEC, especificamente marcadores de UPEC conforme descrito por diversos autores (MULVEY, 1998; MULVEY, 2002; WILES et al., 2008; BIELASZEWSKA et al., 2014; FIROOZEH et al., 2014; MÜELLER, STEPHAN & NÜESCH-INDERBINEN, 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2017; MUNKHDELGER et al., 2017). *E. coli* responsáveis por causar infecções extraintestinais comuns, como infecções do trato urinário e da corrente sanguínea, têm animais como principal reservatório, mas os alimentos também podem estar implicados como reservatório e na veiculação destas cepas (VINCENT et al., 2010; XIA et al., 2011; NORDSTROM et al., 2013; RILEY, 2020). Interessante evidenciar que a ITU já foi demonstrada como uma doença possivelmente veiculada por alimento, uma vez que alguns estudos apontaram que aves e carne de aves comercializadas no varejo carregavam cepas de UPEC (LIU et al., 2018; YAMAJI et al., 2018).

No presente estudo, 19% das cepas isoladas de diferentes origens alimentares apresentaram marcadores de virulência associados às DEC e às ExPEC, simultaneamente. Esta associação já foi previamente descrita na literatura. Lindstedt et al., 2018, avaliaram 168 cepas de *E. coli* provenientes de amostras de fezes humanas, na Noruega, das quais 64% apresentaram genes de virulência associados a essas classes, simultaneamente. Outros estudos também demonstraram a heteropatogenicidade em cepas de *E. coli*. Mariani-Kurkdjian et al. (2014) caracterizaram uma cepa de STEC albergando uma região plasmidial conservada de virulência característica de ExPEC, em isolados de fezes e sangue humanos; Bielaszewska et al. (2014) também identificaram uma STEC de amostras humanas albergando e expressando genes de virulência associado à UPEC.

O genoma de *E. coli* não é estático e a sua plasticidade genética promove uma grande diversidade dentro espécie, contemplando cepas avirulentas e altamente patogênicas, incluindo as cepas híbridas do microrganismo. A presença de conteúdos genéticos previamente associados a classes e patótipos distintos, denominadas cepas híbridas, dificulta a correta classificação diagnóstica (LINDSTEDT et al., 2018; BRAZ, MELCHIOR e MOREIRA, 2020).

O significado clínico dos patógenos híbridos foi claramente demonstrado pelo surto de 2011 causado por *E. coli* O104: H4, uma bactéria com aderência agregativa e produtora de toxina shiga, envolvendo alimento de origem vegetal na Alemanha. O microrganismo, após ter se espalhado para outros países europeus e também para a América do Norte, afetou cerca de 4000 pessoas, levou 54 a óbito e 900 indivíduos a desenvolver HUS, mostrando que perfis de virulência combinados em patógenos entéricos podem ter consequências importantes para

a saúde pública (BIELASZEWSKA et al., 2014; MARIANI-KURKDJIAN et al., 2014; BRAZ, MELCHIOR e MOREIRA, 2020).

Todas as cepas híbridas, albergando tanto genes de virulência associados à DEC quanto à ExPEC foram recuperadas de amostras de frango e salsa. Entre elas, 90% pertenciam aos grupos filogenéticos A e D, relacionados à *E. coli* comensais e patogênicas, respectivamente. Lindstedt et al. (2018), curiosamente, encontraram a maior frequência de cepas híbridas nos filogrupos B2 e B1, também relacionados a cepas patogênicas e comensais, respectivamente.

Entre as cepas recuperadas de amostras de salsa *in natura* e minimamente processada foi observada uma alta correlação com a presença do gene *fimH*, isoladamente e associado a outros marcadores, inclusive o gene *stx₂*, relacionado à STEC. Destaca-se que *fimH* não foi encontrado em nenhuma outra origem alimentar. Um estudo avaliando microrganismos indicadores de qualidade, como a *E. coli*, em amostras de alimentos, encontrou o gene *fimH* em 100% (n=50) das cepas isoladas de vegetais folhosos (alface e espinafre) (SCHEINBERG et al., 2017). Liu et al. (2018) associaram a *E. coli* (ST 131-H22) como um uropatógeno alimentar, que normalmente alberga o marcador *fimH*.

O gene *fimH* desempenha um papel crítico na patogênese das cepas de *E. coli* uropatogênica. No entanto, este marcador, que codifica adesinas fimbriais, parece ser comum entre cepas comensais e ambientais (SABATE et al., 2006; SPURBECK et al., 2012; SCHEINBERG et al., 2017). Guerra et al. (2020) encontraram *fimH* em 100% (n=114) das cepas recuperadas de mastite bovina, em fazendas de gado leiteiro de Minas Gerais e São Paulo, e sugeriram que este é um gene comum para todas as *E. coli* e poderia ser usado, inclusive para o diagnóstico molecular do patógeno. Por outro lado, esse marcador não foi encontrado em nenhuma das cepas isoladas de alimentos de origem animal, nem na preparação purê de batatas, no presente estudo, contrariamente, sugerindo que tal marcador pode apresentar baixa relação com alimentos de origem animal.

Em nosso estudo, o gene *stx₂* foi encontrado em 60% das cepas recuperadas de amostras de salsa. Este é um dado importante, uma vez que vegetais folhosos são consumidos sem sofrer tratamento térmico (FRANCO & LANDGRAF, 2005; GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016; SHAKERIAN, RAHIMI & EMAD, 2016) e, em especial a salsa, muitas vezes nem é submetida a procedimento de sanitização.

E. coli produtora de toxina Shiga tende a colonizar preferencialmente as raízes e a rizosfera de vegetais folhosos. Além disso, tem demonstrado capacidade de ser internalizada pelo tecido vegetal, permanecendo no apoplasto, de maneira endofítica. Isto representa um

risco à segurança do alimento, uma vez que a bactéria em condição endofítica não é facilmente eliminada pelos métodos convencionais de sanitização (MARTÍNEZ-VAZ et al., 2014; MERGET et al., 2019).

O perfil de virulência mais frequente observado nas bactérias isoladas de amostras de frango foi *traT/aer*, responsáveis pela resistência ao soro e pelo transporte de ferro extracelular, respectivamente (JOHNSON & STELL, 2000). Esse perfil já foi observado anteriormente em cepas UPEC isoladas de ITU comunitária no Brasil, (MOREIRA DA SILVA et al., 2017).

Ambos os marcadores *traT* e *aer*, juntos ou isoladamente, foram observados fortemente associados a cepas de infecção urinária grave e são considerados fatores-chave para a manutenção da bactéria no trato urinário do hospedeiro, e sua alta prevalência já foi descrita entre cepas de UPEC (FIROOZEH et al., 2014; MÜELLER, STEPHAN & NÜESCH-INDERBINEN, 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2017; MUNKHDELGER et al., 2017).

O gene *traT*, muito frequente em nossos isolados de carne de frango, isoladamente ou associado a outros genes, é, conforme mencionado anteriormente, considerado um fator de resistência ao soro (MELLATA et al., 2013). A identificação isolada do gene em cepas de *E. coli* de origem fecal de humanos e frango de corte vem sendo observada por diversos autores (BONNET et al., 2009; MESSAILI et al., 2019; DÍAS-JIMÉNEZ et al., 2020).

Estudos fazem relação entre APEC e ExPEC humanas, uma vez que estas classes possuem mecanismos de virulência semelhantes e que podem derivar da mesma linhagem evolutiva, sugerindo que frango seja um reservatório de ExPEC humana, podendo, conseqüentemente ser disseminada pelo consumo de carne de frango (MELLATA, 2013; MANGES, 2016; JOHNSON et al., 2017; JOHNSON & CURTISS, 2018).

Destacamos que cerca de 25% dos isolados oriundos de carne de frango foram caracterizados, em nosso trabalho, como STEC por apresentar o marcador *stx₂*. A presença de STEC em carne e produtos a base de frango já foi demonstrada em trabalhos anteriores e seu consumo tem sido relacionado a casos de HUS, entretanto essas descrições continuam escassas no Brasil (CHINEN et al., 2009; ALONSO et al., 2012; ALONSO et al., 2016).

Vale ressaltar que 15% das cepas recuperadas de amostras de carne de frango albergavam o gene *eae*, encontrado nas EPEC. No entanto, apenas uma cepa (FG54) também apresentava o marcador *bfpA*. Desta forma, as cepas que não apresentaram *bfpA* podem ser classificadas como EPEC atípicas (aEPEC). aEPEC têm sido consideradas patógenos emergentes e encontradas mundialmente, em diferentes origens, como animais, ambiente e

alimentos, enquanto o principal reservatório de EPEC típicas tende a ser os seres humanos (OTERO et al., 2013; ALONSO et al., 2017; DÍAS-JIMÉNEZ et al., 2020).

De acordo com González e Cerqueira (2019), a ocorrência do marcador molecular *eae* em STEC de origem animal é baixa. A não ocorrência dos genes *eae* e *stx₂*, simultaneamente nas cepas estudadas no presente trabalho mostra que nenhuma delas correspondiam à classe das EHEC.

Embora o gene *afa*, tenha sido encontrado em apenas uma cepa isolada de carne de frango, foi relatado previamente que este gene apresentou forte relação com a produção de biofilme, o que pode representar um importante problema de saúde pública, caso ocorra a sua formação nas plantas de produção de alimentos (CRECENCIO et al., 2020).

Aproximadamente a metade das cepas recuperadas de amostras de frutos do mar pertenciam à classe das STEC. Essas cepas foram isoladas tanto de amostras de ostras provenientes da Bahia, quanto de mexilhões da região costeira de Niterói (RJ). Estudos prévios revelaram forte relação entre STEC e frutos do mar (KUMAR et al., 2001; KUMAR et al., 2004; PRAKASAN et al., 2018).

Keller et al. (2019) demonstraram a correlação entre a baixa qualidade microbiológica da água de um estuário de mangue na região da Baía de Vitória (Espírito Santo, Brasil), com a contaminação de mexilhões e ostras, alertando para a possibilidade de estes alimentos serem implicados em surtos de origem alimentar. Considerando que os moluscos bivalves possuem capacidade de filtrar e reter o conteúdo bacteriano do ambiente (RESSURREIÇÃO BRANDÃO et al., 2017), a contaminação antropogênica de ambientes costeiros-marinhos pode impactar diretamente a qualidade microbiológica destes alimentos e contaminá-los com patógenos entéricos (PRAKASAN et al., 2018), como STEC.

Um estudo verificou os impactos da poluição de um emissário submarino de esgoto nas proximidades de Salvador (BA), evidenciando a presença de esgoto não tratado próximo ao emissário e em até 6km de distância (LESSA et al., 2016). Por outro lado, como mencionado anteriormente, um único trabalho mostrou boa qualidade da água em viveiros de ostras na Baía de Todos os Santos (BA), exceto nos períodos chuvosos, quando a carga microbiana era elevada (FREITAS et al., 2017). Um outro trabalho, também destacado anteriormente, conduzido em Niterói (RJ) mostrou que as águas da região costeira se apresentaram poluídas, em virtude da ação humana e que esse impacto era intensificado pela geografia local que favorece o acúmulo de resíduos (SILVA et al., 2016).

Dois marcadores moleculares de virulência relacionados às ExPEC, *flu* (Ag43) e *afa*, foram fortemente associados às cepas recuperadas dos frutos do mar. A proteína

autotransportadora codificada pelo gene *flu* também foi descrita como tendo um papel semelhante a uma adesina, associada à capacidade de formação de biofilme e à propriedade autoagregativa das bactérias (VAN DER WOUDE & HENDERSON, 2008).

O gene *afa*, outro marcador que se apresentou fortemente relacionado às cepas recuperadas das amostras de frutos do mar, pertence a uma família de adesinas afimbriais AFA que são expressas por ExPEC e também podem estar associadas à diarreia em adultos e crianças (CRUZ SPANO et al., 2017; AIJUKA et al., 2018). A família de genes *afa*, que foi descrita em UPEC apresenta uma forte relação genética com o cluster do gene *daa* (adesina de aderência difusa), descrito em DAEC que é reconhecida como agente etiológico de diarreia persistente (LE BOUGUÉNEC & NATARO, 2005).

Estudos mostrando a presença do marcador *afa* em alimentos são bastante escassos. Um único trabalho avaliou a presença e não encontrou este marcador em cepas de *E. coli* provenientes de mexilhões, no Vietnã (HAO VAN et al., 2008). Em nossa amostragem, aproximadamente 30% das cepas recuperadas de frutos do mar foram positivas para este marcador. Estes dados merecem atenção, uma vez que foi demonstrada a capacidade de cepas albergando o gene *afa* de se translocar do trato gastrointestinal para o leito vascular, mediar a invasão tecidual e causar infecções urinárias e bacteremia (KRAWCZYK et al., 2015).

Outro dado que merece atenção foi a presença do gene *cnf1* apenas nas bactérias isoladas dos frutos do mar. CNF1 é um importante fator de virulência das UPEC que proporciona uma maior capacidade de colonização do trato urinário e é responsável por causar danos teciduais e perturbar a barreira epitelial (KNUST & SCHIMIDT, 2010; KATONGOLE et al., 2020). Dados recentes sobre a presença desse gene em cepas de *E. coli* isoladas de alimentos são escassos e em frutos do mar, especificamente, não foram encontrados trabalhos descritos. O gene *cnf1* foi encontrado em cepas recuperadas de carne de porco picada e carne de cordeiro moída, na Irlanda do Norte, mostrando o potencial dos alimentos de origem animal em veicular esse marcador implicados nas ITU em humanos (KADHUM et al., 2006).

Cerca de 89% das cepas de *E. coli* recuperadas da preparação purê de batatas pertenciam a classe das STEC pois apresentavam o gene *stx2*. Até onde se sabe, o presente trabalho é o primeiro a pesquisar e encontrar esse patógeno em purê de batatas no mundo. Tratando-se de alimentação hospitalar, é de fundamental importância que os alimentos fornecidos aos pacientes hospitalizados sejam microbiologicamente seguros, a fim de recuperar seu estado de saúde e minimizar os potenciais prejuízos que alimentos contaminados possam causar a sua recuperação (MIYAHIRA et al., 2018).

Durante o preparo de alimentos onde matérias primas de diversas origens são manuseadas, a higienização insuficiente das mãos e das superfícies de contato com alimentos pode disseminar patógenos dos insumos crus para as preparações prontas, mesmo após a cocção (RANJBAR et al., 2017; MIYAHIRA et al., 2018; MIYAHIRA et al., 2013). Vários estudos demonstraram o papel das superfícies, como tábuas de corte, utensílios e equipamentos, na contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos (RANJBAR et al., 2017; MIYAHIRA et al., 2018; PIENIZ et al., 2019; GHITA et al., 2020).

Estes estudos destacam o risco da contaminação cruzada e a influência da natureza da matéria prima alimentar; isto é, alimentos crus e cozidos, de origem animal e vegetal, por exemplo. O material que compõe a superfície (aço inox, madeira, plástico, entre outros), também pode favorecer à persistência de patógenos, como *E. coli* em superfícies de cozinhas hospitalares, por meio da formação de biofilmes (GUITA et al., 2019; PIENIZ et al., 2019; GHITA et al., 2020).

Aproximadamente metade das cepas isoladas de amostras de leite pasteurizado, neste estudo, foram classificadas como STEC e relacionadas ao grupo filogenético A. Poucos trabalhos realizaram a pesquisa de marcadores moleculares associados à STEC em leite pasteurizado e os que realizaram não encontraram *E. coli* albergando os marcadores *stx*₁ e *stx*₂ (CARNEIRO et al., 2006; HOFFMANN et al., 2014).

Não é possível considerar que não haja relatos na literatura sobre a presença de STEC em amostras de leite pasteurizado, uma vez que um estudo na Índia relata a presença do gene *stx*₂ em 11 das 81 *E. coli* isoladas de amostras de leite, porém não especifica se o resultado encontrado correspondia a amostra de leite cru ou pasteurizado (MANNA et al., 2010).

Estudos anteriores já avaliaram e demonstraram a presença de marcadores moleculares associados à DEC em leite cru (MANNA et al., 2010; AWADALLAH et al., 2016; DE CAMPOS et al., 2017; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2019; ELMONIR et al., 2021). Os trabalhos que pesquisaram estes marcadores em amostras de leite pasteurizado são escassos. Um deles foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa e demonstrou que cerca de 22% dos isolados de amostra de leite pasteurizado pertenciam à classe das EPEC e o sorogrupo mais prevalente entre elas foi o O55 (SILVA et al., 2001).

Até onde se sabe, o presente trabalho foi o primeiro a encontrar cepas de STEC em amostras de leite pasteurizado adquirido no comércio varejista, no Brasil. A importância deste achado está no fato de um alimento termicamente tratado estar veiculando bactérias com potencial patogênico. Este achado pode ser resultado do processamento de matéria prima de baixa qualidade higienicossanitária, com elevada carga microbiana inicial, de falha no

processo de pasteurização ou deficiência na cadeia de frio, bem como do abuso de temperatura durante o armazenamento nos estabelecimentos comerciais (CARNEIRO et al., 2006; AWADALLAH et al., 2016; KOUSHKI et al., 2016;).

Entre as cepas de *E. coli* recuperadas das diversas matrizes alimentares, albergando algum marcador de virulência, o sorogrupos encontrados foram O157 e entre os sorogrupos não-O157 foram O145, O103 e O121. Apesar da reconhecida importância do sorogrupo O157 na etiologia de surtos de origem alimentar (CAPRIOLI, SCAVIA & MORABITO, 2014; TORO et al, 2018; TORRES et al, 2018; GONZÁLEZ E CERQUEIRA, 2019), outros sorogrupos não-O157 têm sido implicados em doenças humanas (JU et al., 2012; LI et al., 2016; ALBONICO et al., 2017; TORO et al., 2018).

As cepas STEC recuperadas de purê de batatas foram sorogrupadas como O157. Até onde se sabe, o presente trabalho é o primeiro a reportar a presença de STEC pertencente ao sorogrupo O157 recuperada de dieta hospitalar no Brasil (RANJBAR et al., 2017; PIENIZ et al., 2019; GHITA et al., 2020)

As cepas STEC O157 isoladas de purê de batatas foram classificadas como pertencendo ao grupo filogenético A, geralmente associado a cepas comensais humanas, sugerindo uma possível contaminação oriunda dos manipuladores. A adoção de práticas de higienização das mãos é um dos métodos mais simples e eficazes para reduzir os riscos das doenças veiculadas por alimentos relacionados aos manipuladores (PRINCE-GUERRA et al., 2020).

Um estudo conduzido no Reino Unido, observou, de forma oculta por meio do circuito interno de câmeras, o comportamento dos manipuladores de alimentos de uma empresa, para avaliar a conformidade dos procedimentos de higienização das mãos. Neste estudo, somente 2% das lavagens das mãos antes de entrar na área de produção estavam em conformidade com o protocolo preconizado pela empresa, destacando a discrepância entre o treinamento de higienização das mãos e o comportamento dos colaboradores na prática (EVANS, SAMUEL & REDMOND, 2020)

A *E. coli* O157:H7 é um sorotipo importante, muito associado a surtos de origem alimentar em todo o mundo, sendo um grande problema de saúde pública (CAPRIOLI, SCAVIA & MORABITO, 2014; TORO et al, 2018; TORRES et al, 2018; GONZÁLEZ E CERQUEIRA, 2019). No presente estudo, as cepas STEC do sorogrupo O157 não carregavam o antígeno flagelar H7, sendo assim, nenhuma delas eram EHEC. Ghita et al. (2020), no Marrocos, não encontraram EHEC entre as amostras de alimentos, superfícies de contato com

alimentos e mãos de manipuladores em cozinha hospitalar, embora *E. coli* estivesse presente nas mãos de 45% dos avaliados.

O fato de termos encontrado cepas O157, sem o antígeno flagelar H7, não torna o achado menos importante, principalmente por se tratar de um alimento submetido ao tratamento térmico, pronto para consumo de pacientes hospitalizados e possivelmente imunocomprometidos. Acredita-se que a contaminação por esta bactéria tenha ocorrido pós-cozimento, provavelmente, durante o processamento das batatas cozidas com o leite no liquidificador. Vale ressaltar, como já discutido previamente, que a contaminação deste mesmo equipamento por microrganismos, inclusive com resistência a antimicrobianos, já foi descrita anteriormente por nosso grupo (MIYAHIRA et al., 2018; MIYAHIRA et al., 2013).

Entre os mais de 140 sorogrupos de *E. coli* não-O157, os seis mais implicados em surtos de doenças de origem alimentar (“*Big six*”) são O26, O45 O103, O111, O121 e O145 (USDA, 2012; EFSA, 2013; GOULD et al., 2013; SHRIDHAR et al., 2019). Entretanto, a maioria dos achados disponíveis na literatura são de cepas isoladas de amostras clínicas, animais e de fezes (FAN et al., 2019; SHRIDHAR et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2020; ENGELEN et al., 2021). Em alimentos, os sorogrupos O103 e O145 estavam entre os mais frequentes em cepas isoladas de leite cru (ALBONICO et al., 2017); O26, entre os isolados de alimentos crus e prontos pra consumo (RANJBAR et al., 2017) e O103 em bactérias recuperadas de carne moída (WASILENKO et al., 2014).

Nenhum fenótipo de aderência à linhagem de células HEP-2 foi observado em 65% das nossas cepas recuperadas de todas as origens alimentares. Adicionalmente, o fenótipo de aderência em cepas que não albergavam genes de virulência que codificam adesinas foi observado. Considerando que a adesão é o primeiro passo na colonização ou infecção e é facilitada por adesinas fimbriais ou afimbriais que se ligam aos receptores da célula hospedeira, esses resultados sugerem que outros marcadores moleculares, que não tenham sido contemplados na nossa pesquisa, estejam relacionados com o fenótipo de adesão, tais como *hra*, *tsh*, *csgA*, *fedA*, *fasA*, entre outras (FRÖMMEL et al., 2013; SÁNCHEZ et al., 2021).

Entre as cepas recuperadas de amostras de salsa, os fenótipos de aderência agregativa, aderência difusa e aderência agregativa ao vidro estavam associados aos marcadores de virulência *stx2* e *fimH* isolados ou em associação. De acordo com o que discutimos anteriormente, o gene *fimH* desempenha um papel crítico na patogênese das cepas de *E. coli* uropatogênica e codifica adesinas fimbriais que poderiam estar associadas aos fenótipo de

aderência encontrados (SABATE et al., 2006; SPURBECK et al., 2012; SCHEINBERG et al., 2017).

A cepa FG54, recuperada de amostras de frango, merece destaque por albergar os marcadores *eae* e *bfpA*, sendo classificada como tEPEC. Curiosamente essa cepa não produziu o padrão fenotípico característico de aderência localizada (LA) e não apresentou qualquer fenótipo de aderência. Por outro lado, duas cepas aEPEC, também isoladas de frango (FG53 e FG55), produziram fenótipo de aderência agregativa (AA) ao vidro e não às células HEp-2. Segundo Abe et al. (2009), aEPEC por não apresentarem o plasmídeo de virulência EAF responsável pela codificação de um pílus, denominado Bundle-Forming Pilus (BFP) podem produzir padrões de aderência diferentes de LA.

Conforme mencionado previamente, o gene *afa* foi bastante frequente entre as cepas recuperadas de frutos do mar. Este marcador apresenta uma forte relação genética com o cluster do gene *daa* (adesina de aderência difusa), descrito em DAEC (LE BOUGUÉNEC & NATARO, 2005). Nenhuma cepa proveniente desta origem apresentou esse fenótipo de aderência, sugerindo uma possível não expressão deste marcador.

Dois cepas, provenientes de amostras de mexilhões, que albergavam o gene *afa*, merecem destaque por apresentarem fenótipos de aderência LA *like* e de aderência difusa às células Hep-2. Este achado alerta que a relação entre o fenótipo e a presença do referido marcador pode não estar diretamente ligada. Além disso, o mecanismo regulador da expressão deste marcador não é bem conhecido (VAN DER WOUDE & HENDERSON, 2008).

Também já foi discutido anteriormente que a proteína autotransportadora Ag43, codificada pelo gene *flu*, apresenta função semelhante à adesina, podendo estar associado à capacidade de formação de biofilme e à propriedade autoagregativa das bactérias (VAN DER WOUDE & HENDERSON, 2008). Curiosamente, nos ensaios fenotípicos de aderência nenhuma das cepas recuperadas de frutos do mar, albergando este marcador, apresentou fenótipo agregativo.

Cinco cepas *E. coli* isoladas de leite pasteurizado apresentaram fenótipo de aderência agregativa, três delas albergando o gene *stx2* e duas o *flu* (Ag43). Este último, já havia sido descrito como uma adesina associada à capacidade autoagregativa das células (VAN DER WOUDE & HENDERSON, 2008). Um estudo, anteriormente mencionado, conduzido por nossa equipe encontrou cerca de 27% das cepas de EPEC apresentando padrão de aderência agregativa em cepas isoladas de leite pasteurizado, no entanto, os marcadores moleculares de

virulência encontrados foram distintos dos achados no presente estudo (CARNEIRO et al., 2006).

A relação entre a presença de genes de virulência que codificam adesinas e os fenótipos de aderência nem sempre foi observada em nossas amostras. Isso pode ser justificado, em parte, pelo fato de termos realizado os ensaios utilizando apenas uma linhagem celular. Embora HEp-2 seja a linhagem mais comumente empregada em ensaios de adesão para *E. coli*, a possibilidade de diferenças no padrão de aderência entre linhagens celulares de diferentes origens já foi demonstrada (FRÖMMEL et al., 2013).

Apesar de 40% das nossas cepas albergarem o gene *stx₂*, este marcador não mostrou expressão fenotípica de produção da toxina Shiga em ensaio de toxicidade com linhagem de células Vero. Aparentemente estas cepas de STEC, apesar de albergar o gene, não expressavam o fator de virulência. Por se tratar de cepas originárias de amostras alimentares, cuja composição eram as mais diversas, pode-se supor que fatores estressantes associados à composição do alimento possam ter induzido a inibição da expressão de Stx (SHENG; RASGO & ZHU et al., 2016).

Este estudo mostrou que alimentos muito populares, de diferentes matrizes alimentares e provenientes de diferentes localidades no Brasil, albergam genes de virulência associados à DEC e à ExPEC implicados em doenças como diarreia persistente, HUS e ITU. Além disso, a presença de STEC em amostras de alimentos deve ser vista com preocupação, principalmente devido a sua baixa dose infectante. Estes resultados alertam para o potencial papel destes alimentos em veicular marcadores moleculares de virulência e para a necessidade de adotar as boas práticas de higiene e produção de alimentos, a fim de evitar possíveis surtos de doenças de origem alimentar.

CONCLUSÕES

As diferentes matrizes alimentares albergavam cepas de *E. coli* pertencentes a todos os grupos filogenéticos pesquisados, sendo os grupos A e B1 os mais frequentes. Além disso, foi demonstrado que o grupo filogenético A, frequentemente associado a bactérias comensais, pode conter cepas albergando genes de virulência.

Tanto os alimentos de origem animal quanto vegetal estudados veiculavam cepas com perfis moleculares de virulência associados à STEC, EPEC e UPEC. Entre as STEC, o gene *stx₂* foi o único marcador encontrado, no entanto, nenhuma cepa expressou a produção de toxina Shiga, no teste de citotoxicidade em linhagem de células Vero.

Foi demonstrado que salsa, frango, mexilhões e purê de batatas (dieta hospitalar) veiculam cepas de *E. coli* com sorogrupos implicados em DOAs, O121, O103, O145 e O157, respectivamente.

Os alimentos estavam implicados na veiculação de cepas com fenótipo de aderência agregativa, porém sem a presença de marcadores moleculares para EAEC, e com fenótipos de aderência difusa e Localizada *Like*, sugerindo que outros genes estejam envolvidos na expressão destas características fenotípicas.

Este trabalho mostrou que alimentos de diferentes origens, incluindo aqueles que são comumente consumidos sem tratamento térmico (salsa e ostra); ou que são ocasionalmente submetidos a tratamento térmico insuficiente (frango e frutos do mar) e até mesmo termicamente tratados e prontos para consumo (leite pasteurizado e dieta hospitalar), estão veiculando cepas de *E. coli* albergando fatores de virulência, associados a patótipos de DEC, ExPEC, bem como o perfil híbrido (HyPEC) e cepas pertencentes ao sorogrupo O157.

O presente estudo descreveu, pela primeira vez, cepas de *E. coli* recuperadas de preparação purê de batatas de dieta hospitalar veiculando marcadores para STEC.

O trabalho alerta para o papel dos diferentes alimentos como um fator para o agravamento do estado de saúde de pacientes e até mesmo para uma possível ocorrência de surtos de DOA, ressaltando a importância da realização/revisão dos procedimentos de boas práticas de produção de alimentos, a fim de minimizar a contaminação por bactérias potencialmente patogênicas.

REFERÊNCIAS

- Abe C.M., Trabulsi L.R., Blanco J., Blanco M., Dahbi G, Blanco J.E. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) Eae-negative stx (-) genetic profile. *Diagn microbial Infect dis*; 64:357–65. 2009
- Aijuka, M and Buys, EM. “Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: implications for food safety and public health,” **Food Microbiology**, vol. 82, pp. 363–370. 2019
- Aijuka, M; Santiago, AE; Girón, JA; Nataro, JP; Buys, EM. Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. **Int J Food Microbiol.** 278, 44–51, 2018
- Albonico , F; Gusmara , C; Gugliotta, T; Loiacono, M; Mortarino, M; Zecconi, A. A new integrated approach to analyze bulk tank milk and raw milk filters for the presence of the *E. coli* serogroups frequently associated with VTEC status. **Res Vet Sci.** Dec;115:401-406, 2017
- Alconcher, LF; Balestracci, A; Coccia, PA; Suarez, ADC; Ramírez, FB; Monteverde, ML; Perez Y Gutiérrez, MG; Carlopio, PM; Principi, I; Estrella, P; Micelli, S; Leroy, DC; Quijada, NE; Seminara, C; Giordano, MI; Solís, SBH; Saurit, M; Caminitti, A; Arias, A; Liern, M; Rivas, M. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Argentina: update of serotypes and genotypes and their relationship with severity of the disease. **Pediatr Nephrol.** Feb 18, 2021
- Alonso, MZ; Krüger, A; Sanz, ME; Padola, NL; Lucchesi, PMA. Serotypes, virulence profiles and *stx* subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products Serotipos, perfiles de virulencia y subtipos de *stx* en *Escherichia coli* productor de toxina Shiga aislados de productos de pollo. **Rev Argent Microbiol.** V. 48:4, October–December, Pages 325-328, 2016
- Alonso, CA; Mora, A; Diaz, D; Blanco, M; Gonzalez-Barrio, D; Ruiz-Fons, F; Simon, C; Blanco, J; Torres, C. Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. **Vet. Microbiol.**, 207, 69–73, 2017
- Alonso, MZ; Lucchesi, PMA; Rodríguez, EM; Parma, AE; Padola, NL. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control.** 23, 351-355, 2012
- Amson, GV. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do paraná –Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. Agrotec.**, lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006
- Associação brasileira de proteína animal. Relatório anual, 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais> . Acesso em: 20 de abril de 2019

- Awadallah, MA; Ahmed, HA; Merwad, AM; Selim, MA. Occurrence, genotyping, shiga toxin genes and associated risk factors of *E. coli* isolated from dairy farms, handlers and milk consumers. **Vet J.** 217, 83–88, 2016
- Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Int J Food Microbiol**, v.61, p.1-10, 2000
- Bautista-de León H., Góez-Aldapa C.A., Rangel-vargas E., Vázquez-Barrios E. Castro-Rosas J.. Frequency of indicator bacteria, salmonella and Diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat Cooked vegetable salads from mexican restaurants **Letters in applied microbiology** 56, 414 - 420. 2013
- Belluco, S. *E. coli* and *Enterobacteriaceae* counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v.60, p.269-280, 2016
- Bergeron, CR; Prussing, C; Boerlin, P; Daignault, D; Dutil, L; Reid-Smith, RJ; Zhanel, GG; Manges, AR. Chicken as Reservoir for *Escherichia coli* in Humans, Canada Extraintestinal Pathogenic. **Emerg Infect Dis.** Mar;18(3):415-21, 2012
- Beutin, L; Prada, J; Zimmerman, S; Stephan, R; Orskov, L. & Orskov, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Zentralbl.Bakteriol.Hyg.**, 267:576-588. 1988
- Bielaszewska, M; Schiller, R; Lammers, L; Bauwens, A; Fruth, A; Middendorf, B; Schmidt, MA; Tarr, PI; Dobrindt, U; Karch, H; Mellmann, A. Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. **EMBO Mol Med.** Mar;6(3):347-57. 2014
- Blattner, FR; Plunkett, G; Bloch, CA; Perna, NT; Burland, V; Riley, M; Collado-Vides, J; Glasner, JD; Rode, CK; Mayhew, GF; Gregor, J; Davis, NW; Kirkpatrick, HA; Goeden, MA; Rose, DJ; Mau, B; Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science.** V.277, p1453-74, 1997
- Bonnet C; Diarrassouba F; Brousseau R; Masson L; Topp, E; Diarra, MS. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. **Appl Environ Microbiol.** 75, 6955-6962, 2009
- Braz, VS; Melchior, K; Moreira, CG. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 10:548492, 2020
- Busani, L; Boccia, D; Caprioli, A; Ruggeri, FM; Morabito, S; Minelli, F; Lana, S; Rizzoni, G; Giofre, F; Mazzeo, M; Tozzi, AE. Public health implications of a case of haemolytic-uraemic syndrome associated with a concomitant outbreak of mild gastroenteritis in a small rural community. **Epidemiol Infect** 134:407–413. 2006
- Callejón, RM; Rodríguez-Naranjo, MI; Ubeda, C; Hornedo-Ortega, R; Garcia-Parrilla, MC; Troncoso, AM. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. **Foodborne Pathog Dis**, Jan;12(1):32-8. 2015

Caprioli, A; Scavia, G; Morabito, S. Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr.** Dec;2(6), 2014

Carlos, C; Pires, MM; Stoppe, NC; Hachich, EM; Sato, MI; Gomes, TA; Amaral, LA and Ottoboni, LM. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiol.** 10:161–171. 2010

Carneiro, LAM; Lins, MC; Garcia, FRA; Silva, APS; Mauller, PM; Alves, GB; Rosa, ACP; Andrade, JRC; Freitas-Ameida, AC; Queiroz, MLP. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurized milk. **Int J Food Microbiol.** 108:15–21, 2006.

Casagrande, RA; Machado, G; Guerra, PR; Castro, LA; Spanemberg, A; Silva, SC; Cardoso, MRI; Driemeier, D. Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal. **Pesq. Vet. Bras.** 37(9):949-957, set, 2017

Cavalcanti, AMF; Hernandez, RT; Takagi, EH; Guth, BEC; Ori, EL; Pinheiro, SRS; Andrade, TS; Oliveira, SL; Cergole-Novella, MC; Francisco, GR; Santos, LF. Virulence Profiling and Molecular Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) from Human Sources in Brazil. **Microorganisms.** Feb; 8(2): 171, 2020

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). Salmonella: prevention. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/prevention.html>. Acesso em: 20 de abril de 2019

Centers For Disease Control And Prevention (CDC). **Annual summaries of foodborne outbreaks.** (2018). Disponível Em: <https://www.cdc.gov/fdoss/annual-reports/index.html>. Acesso Em: 20 de abril de 2019

Cirino, FPSC. Caracterização da resistência aos antimicrobianos em enterobactérias isoladas de leite pasteurizado comercializado no município do estado do Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 91p. 2017

Chinen, I; Epszteyn, S; Melamed, CL; Aguerre, L; Martínez Espinosa, E; Motter, MM; Baschkier, A; Manfredi, E; Miliwebsky, EE; Rivas; M. Shiga toxin- producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **Int J Food Microbiol.** 132, pp. 167-171, 2009

Clements A., Young J.C., Constantinou N., Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut microbes,** 3:71–87, 2012

Clermont O; Bonacorsi S; Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol.** 66:4555-8. 2000

Clermont, O. Christenson, JK; Denamur, E; Gordon, DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports.** 5(1), 58–65. 2013

Clermont, O; Dixit, VA; Vangchhia, B; Condamine, B; Dion, S; Bridier-Nahmias, A; Denamur, E; Gordon, D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environ Microbiol.** Aug;21(8):3107-3117, 2019

Cohen M.B., Nataro J.P, Bernstein D.I., Hawkins J, Roberts N, Staat M.A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. **J. Pediatr.** 146:54–61. 2005

Costard S, Espejo L, Groenendaal H, Zagmutt FJ. Outbreak-Related Disease Burden Associated with Consumption of Unpasteurized Cow's Milk and Cheese, United States, 2009–2014. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 23, No. 6, June 2017

Crecencio, RB; Brisola, MC; Bitnera, D; Frigo, A; Rampazzo, L; Borges, KA; Furian, TQ; Salle, CTP; Moraes, HLS; Faria, GA; Da Silva, AS; Stefania, LM. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. **Infect Genet Evol.** V.84, 104:355, October, 2020

Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat rev microbial**; 8: 26-38. 2010

Croxen,M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews.** vol 26 n 4 p. 822–880 october, 2013

De Campos, AC, Puño-Sarmiento, JJ; Medeiros, LP; Gazal, LE; Maluta, RP; Navarro, A; Kobayashi, RTK; Fagan, EP and Nakazato, G. Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from cheese made from unpasteurized milk in Brazil. **Foodborne Pathog. Dis.** 15:94–100. 2018

Denamur, E; Clermont, O; Bonacorsi, S; Gordon, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol.** Jan;19(1):37-54, 2021

Dias, RCB. Prevalência e caracterização de amostras de *Escherichia coli* diarrreio gênica isoladas de crianças na cidade de Botucatu, São Paulo. **Dissertação de mestrado.** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2015

Dias, R.C.B, Dos Santos B.C, Dos Santos L.F., Vieira M. A, Yamatogi R.S, Mondelli A.L, Sadatsune T, Sforcin J.M, Gomes T.A.T, Hernandez R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical Enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in botucatu, São Paulo state, Brazil. **Apmis**; 124: 299–308. 2016

Díaz-Jiménez, D; García-Meniño, I; Herrera, A; García, V; López-Beceiro, AM; Alonso, MP; Blanco, J; Mora, A. Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 *eae*-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. **Antibiotics** 9, 192, 2020

Donnenberg, MS; Finlay, BB; Rosenshine, I; Kaper, JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infect Immun.** 60(6):2541-3. 1992

Edge TA, El-Shaarawi A, Gannon V, Jokinen C, Kent R, Khan IUH, Koning W, Lapen D, Miller J, Neumann N, Phillips R, Robertson W, Schreier H, Scott A, Shtepani I, Topp E, Wilkes G, van Bochove E. Investigation of an *Escherichia coli* environmental benchmark for waterborne pathogens in agricultural watersheds in Canada. **J Environ Qual**, 41:21–30. 2012

Elmonir, W; Shalaan, S; Tahoun, A; Mahmoud, SF; Remela, EMA; Eissa, R; El-Sharkawy, H; Shukry, M; Zahran, RN. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods of cattle origin, diarrheic cattle, and diarrheic humans in Egypt. **Gut Pathog.** Feb 5; 13(1):8, 2021

Engelen, F; Thiry, D; Devleeschauwer, B; Mainil, J; De Zutter, L; Cox, E. Occurrence of 'gang of five' Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups on Belgian dairy cattle farms by overshoe sampling. **Lett Appl Microbiol.** Apr;72(4):415-419, 2021

Etcheverría, AI; Padola, NL; Sanz, ME; Polifroni, R; Krüger, A; Passucci, J. Occurrence Of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) On carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. **Meat Sci.** 86, 2010.

Ethelberg S, Lisby M, Bottiger B, Schultz Ac, Villif A, Jensen T, Olsen Ke, Scheutz F, Kjelso C, Muller L. Outbreaks Of Gastroenteritis Linked To Lettuce, Denmark, January 2010. **Euro Surveill** 15:1948. 2010

European Food and Safety Authority (EFSA). “poultry meat inspection: efsa reviews risks for public health.” Press release, June 28. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120629.htm>. Acesso em: 27 de abril de 2019

Evans, EW; Samuel, EJ; Redmond, EC. A case study of food handler hand hygiene compliance in high-care and high-risk food manufacturing environments using covert-observation. **Int J Environ Health Res.** 2020 Jul 7;1-14, 2020

Fan, R; Shao, K; Yang, X; Bai, X; Fu, S; Sun, H; Xu, Y; Wang, H; Li, Q; Zhang, J; Xiong, Y. High prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle detected by combining four selective agars. **BMC Microbiol.** Sep 5;19(1):213, 2019

Feng P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh produce—a food safety dilemma. **Microbiol Spectr.** 2014

Ferreira, MRA; Stella, AE; Freitas-Filho, EG; Silva, TS; Nascimento, KA; Pinto, JFN; Dias, M; Moreira, CN. Distribution of the stx1 and stx2 genes in *Escherichia coli* isolated from milk cattle according to season, age, and production scale in southwestern region of Goiás, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v.70, n.6, p.1807-1813. 2018

Fibke, CD; Croxen, MA; Geum, HM; Glass, M; Wong, E; Avery, BP; Daignault, D; Mulvey, MR; Reid-Smith, RJ; Parmley, EJ; Portt, A; Boerlin, P; Manges, AR. Genomic Epidemiology of Major Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Lineages Causing Urinary Tract Infections in Young Women Across Canada. **Open Forum Infect Dis.** 9, 6(11):ofz431, 2019

Firoozeh, F; Saffari, M; Neamati, F; Zibaei, M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. **Int J Infect Dis.** 29:219–22, 2014

Food and Agriculture Organization of The United Nations. (2013). Global aquaculture production statistics Database updated to 2013. Summary information. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4899e.pdf>. Acesso em : 20 de abril de 2019.

Franco. M, Landgraf, B.D.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6 ed. São paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

Fratamico, PM ; DebRoy, C; Liu, Y; Needleman, DS; Baranzoni, GM and Feng, P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology** Vol. 7:644. 2016

Frömmel, U; Lehmann, W; Rödiger, S; Böhm, A; Nitschke, J; Weinreich, J; Groß, J; Roggenbuck, D; Zinke, O; Ansorge, H; Vogel, S; Klemm, P; Wex, T; Schröder, C; Wieler, LH; Schierack, P. Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. **Appl Environ Microbiol.** Oct; 79(19): 5814–5829, 2013

Fusco G, Aprea G., Galiero G., Guarino A, Viscardi M. *Escherichia coli*, salmonella spp., hepatitis a virus and norovirus in bivalve molluscs in southern italy. **Veterinaria italiana.** 49 (1): 55-58. 2013

Gaytán, MO; Martínez-Santos, VI; Soto, E; González-Pedrajo, B. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. **Front Cell Infect Microbiol.** Oct 21; 6:129, 2016

Ghita, BT; Bennani, L; Berrada, S; Benboubker, M; Bennani, B. Evaluation of hygienic conditions of food contact surfaces in a hospital kitchen in Morocco. **Iran. J. Microbiol.** vol. 11, n. 6, 527-534, Dec, 2019.

Ghita, BT; Bennani, L; Berrada, S; Benboubker, M; Bennani, B. Molecular Serotyping and Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated in Hospital Catering Service in Morocco. **Int J Microbiol.** vol. 2020, n. 5, 961-521. 19 Aug, 2020

Gomes, BC., Franco, BDGM., De Martinis, ECP. Microbiological Food Safety Issues In Brazil: Bacterial Pathogens. **Foodborne Pathogens And Disease**, 10: 197–205. 2013

Gomes, OC. Susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de enterobactérias isoladas de preparação de purê de batata elaborada em cozinha hospitalar. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 107p. 2017

Gomes, TAT; Elias, WP; Scaletsky, ICA; Guth, BEC; Rodrigues, JF; Piazza, RMF; Ferreira, LCS; Martinez, MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol.** 47, 3–30, 2016

Gómez-Aldapa, CA; Segovia-Cruz, JA; Cerna-Cortes, JF; Rangel-Vargas, E; Salas-Rangel, LP; Gutiérrez-Alcántara, EJ; Casrto-Rosas, J. Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. **Food Microbiol.** 59, 97-103, 2016

González, AGM; Cerqueira, AMF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. **J App Microbiol.** 128, 1568-1582, 2019

González, AGM; Cerqueira, AMF; Guth, BEC; Coutinho, CA; Liberal, MHT; Souza, RM; Andrade, JRC. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. **J Appl Microbiol.** 121, 1130–1143, 2016

Gordon, DM; clermont, O; toley, H; Denamur, E. Assigning *Escherichia coli* strain to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology.** V.10, n.10, p. 2484-2496, 2008.

Gould, LH; Mody, RK; Ong, KL; Clogher, P; Cronquist, AB; Garman, KN; Lathrop, S; Medus, C; Spina, NL; Webb, TH. 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 Pathog. Dis.** 10:453–460, 2013.

Guerra, ST; Orsi, H; Joaquim, SF; Guimarães, FF; Lopes, BC; Dalanezi, FM; Leite, DS; Langoni, H; Pantoja, JCF; Rall, VLM; Hernandez, RT; Lucheis, SB; Ribeiro, MG. *Short communication:* Investigation of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. **J Dairy Sci.** Vol. 103. 4, 2020

Gutiérrez, S; Díaz, L; Reyes-Jara, A; Yang, X; Meng, J; González-Escalona, N; Toro, M. Whole-Genome Phylogenetic Analysis Reveals a Wide Diversity of Non-O157 STEC Isolated From Ground Beef and Cattle Feces. **Front Microbiol.** Jan 18;11:622:663, 2021

Hamilton, MJ; Hadi, AZ; Griffith, JF; Ishii, S; Sadowsky, MJ. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. **Water Res.** Oct;44(18):5463-73, 2010

Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y. A Foodborne Outbreak Of Gastrointestinal Illness Caused By Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Serotype O169:H41 In Osaka, Japan. **Jpn J Infect Dis** 66:530–533. 2013

Herman, Km; Hall, Aj; Gould, Lh. Outbreaks Attributed To Fresh Leafy Vegetables, United States, 1973–2012. **Epidemiol Infect** 143:3011–3021. 2015.

Hoffmann, S; Pieretti, GG; Fiorini, A; Patussi, EV; Cardoso, RF; Mikcha, JMG. Shiga-Toxin Genes and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Pasteurized Cow Milk in Brazil. **J Food Sci.** v. 79, n. 6, 2014

Hutinel, M; Fick, J; Larsson, DGJ; Flach, CF. Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer. **Environ Pollut.** Feb 13;276:116733, 2021

Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iran. J. Microbiol.** 4 (3) : 102-117. 2012.

Jakobsen ,L.; Garneau, P.; Bruant , G.; Harel, J.; Olsen, SS; Porsbo, LJ; Hammerum, AM; Frimodt-Møller, N. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 31:1121–1129. 2012

Jayme, MMA. Caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões Perna perna. **Tese (Doutorado em Microbiologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 126p. 2018

Johnson, JR; Russo, TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad E coli”. **J Lab Clin Med**. Vol 139, nº 3, 2002

Johnson JR; Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**. 81:261–72, 2000

Johnson, TJ; Wannemuehler, Y; Johnson, SJ.; Stell, AL; Doetkott, C; Johnson, JR; Kim, KS; Spanjaard, L and. Nolan, LK. Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens. **Applied And Environmental Microbiology**. Vol. 74, p. 7043–7050, No. 22. Nov. 2008

Ju, W; Shen, J; Li, Y; Toro, Ma; Zhao, S; Ayers, S; Najjar, Mb; Meng, J. Non- O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* In Retail Ground Beef And Pork In The Washington Dc Area. **Food Microbiol**. 32, 371-377. 2012.

Jung, Y, Jang H, Matthews, KR. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. **Microbial biotechnology**, 7, 517–527, 2014

Kadhun, HJ; Ball, HJ; Oswald, E; Rowea, MT. Short communication: Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland. **Food Microbiol**. 23, 491–497, 2006

Kadhun, HJ; Finlay, D; Rowe, MT; Wilson, IG; Ball, HJ. Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and faecal samples **Epidemiol Infect**. 136(6): 752–760, Jun, 2008

Kadry, AA; Al-Kashef, NM; El-Ganiny, AM. Distribution of genes encoding adhesins and biofilm formation capacity among Uropathogenic *Escherichia coli* isolates in relation to the antimicrobial resistance. **Afri Health Sci**. 20(1):238-47, 2020

Kaper, JB; Nataro, JP; Mobley, HL. Pathogenic *Escherichia Coli*. **Nat Rev Microbiol**. 2:123–14, 2004

Kargar, M; Homayoon, M. Prevalence of shiga toxins (*stx1*, *stx2*), *eaeA* and *hly* genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. **Asian Pac J Trop Med**. Jan;8(1):24-8. 2015

Karmali Ma. Host And Pathogen Determinants Of Verocytotoxin-Producing *Escherichia Coli*-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Kidney Int** 112:S4–S7. 2009

Katongole, P; Nalubega, F; Florence, NC; Asiimwe, B; Andia, I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. **BMC Infect Dis.** Jun 29;20(1):453, 2020

Kawano, K; Okada, M; Haga, T; Maeda, K; Goto, Y. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in shiga toxin- producing *Escherichia coli* serotype O157. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 27: 227-232, 2008

Keller, R; Pratte-Santos, R; Scarpati, K; Martins, AS; Loss, SM; Fumian, TM; Miagostovich, MP; Cassini, ST. Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil. **Food Environ Virol.** Sep;11(3):288-296, 2019

Khalil, RKS; Gomaa, MAE. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fruits and vegetables sold at local street markets in Alexandria, Egypt. **Food Sci Technol.** 74, 199-210, 2016

Kim, JS; Lee , MS; Kim, JH. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. **Front Cell Infect Microbiol.** V. 10: 273, Jun, 2020

Kimkes, TEP; Heinemann, M. How bacteria recognise and respond to surface contact. **FEMS Microbiol Rev.** Jan; 44(1): 106–122, 2020

Kintz, E; Byrne, L; Jenkins, C; McCARTHY, N; Vivancos, R; Hunter, P. Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Linked to Sprouted Seeds, Salad, and Leafy Greens: A Systematic Review. **J Food Prot,** Nov; 82(11):1950-1958. 2019

Knust, Z; Schmidt, G. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)—A Growing Toxin Family. **Toxins (Basel).** 2(1): 116–127, Jan, 2010

Köhler, CD; Dobrindt, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **Int J Med Microbiol.** Dec;301(8):642-7, 2011

Kotłowski, R; Grecka, K; Kot, B; Szweda, P. New Approaches for *Escherichia coli* Genotyping. **Pathogens.** v.9, n.73, 2020

Koushki, M; Koohy-Kamaly, P; Azizkhani, M; Hadinia, N. Microbiological quality of pasteurized milk on expiration date in Tehran, Iran. **J Dairy Sci.** v. 99, n. 3, 2016

Krawczyk, B; Śledzińska, A; Szemiako, K; Samet, A; Nowicki, B; Kur, J. Characterisation of *Escherichia coli* isolates from the blood of haematological adult patients with bacteraemia: translocation from gut to blood requires the cooperation of multiple virulence factors. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 34(6): 1135–1143, 2015

Kumar, HS; Karunasagar, I; Karunasagar, I; Teizou, T; Shima, K; Yamasaki, S. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. **FEMS Microbiol Lett .** Apr 1;233(1):173-8, 2004

Kumar, HS; Otta, SK; Karunasagar, I; Karunasagar, I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Lett Appl Microbiol.** Nov;33(5):334-8, 2001

Lanata CF, Fischer-Walker C.L, Olascoaga A.C, Torres C.X., Aryee M.J., Black R.E. Global causes of Diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. **Plos one**, 2013

Le, QP; Ueda, S; Nguyen, TNH; Dao, TVK; Hoang, TAV; Tran, TTN; Hirai, I; Nakayama, T; Kawahara, R; Do, TH; Vien, QM; Yamamoto, Y. Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam. **Foodborne Pathog Dis.** Aug;12(8):719-25. 2015

Le Bouguéneq, C; Nataro, JP. Adhesins of Diffusely Adherent and Enteroaggregative *Escherichia coli* . *EcoSal Plus* 1(2), 2005

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

Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, 2(1), 63-76. PMID:12917803. 2003

Liu, CM; Stegger, M; Aziz, M; Johnson, TJ; Waits, K; Nordstrom, L; Gauld, L; Weaver, B; Rolland, D; Statham, S; Horwinski, J; Sariya, S; Davis, GS; Sokurenko, E; Keim, P; Johnson, JR; Price, LB. *Escherichia coli* ST131- *H* 22 as a Foodborne Uropathogen. **mBio.** Aug 28;9(4):e00470-18, 2018

Luna, GM; Vignaroli, C; Rinaldi, C; Pusceddu, A; Nicoletti, L; Gabellini, M; Danovaro, R; Biavasco, F. Extraintestinal *Escherichia coli* Carrying Virulence Genes in Coastal Marine Sediments. **Appl Environ Microbiol.** Vol. 76, No. 17, p. 5659–5668, 2010

Lüthje, P; Brauner, A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. **Adv Microb Physiol.** v. 65:337-72, 2014

Luu, QH; Nguyen, TLA; Pham, TN; Vo, NG; Padungtod, P. Antimicrobial use in household, semi-industrialized, and industrialized pig and poultry farms in Vietnam. **Prev Vet Med.** Feb 9;189:105292. 2021

Macdonald E, Moller Ke, Wester Al, Dahle Ur, Hermansen No, Jenum Pa, Thoresen L, Vold L. An Outbreak Of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (Etec) Infection In Norway, 2012: A Reminder To Consider Uncommon Pathogens In Outbreaks Involving Imported Products. **Epidemiol Infect** 143:486–493. 2015

Machado-Moreira, B; Richards, K; Brennan, F; Abram, F; Burgess, CM. Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? **Compr Rev Food Sci Food Saf.** Nov;18(6):1727-1750. 2019

- Madoshi, BP; Kudirkiene, E; Mtambo, MMA; Muhairwa, AP; Lupindu, AM; Olsen, JE. Characterisation of Commensal *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Cattle and Their Attendants in Tanzania. **PLoS One**, Dec 15;11(12):e0168160. 2016
- Mageiros, L; Méric, G; Bayliss, SC; Pensar, J; Pascoe, B; Mourkas, E; Calland, JK; Yahara, K; Murray, S; Wilkinson, TS; Williams, LK; Hitchings, MD; Porter, J; Kemmett, K; Feil, EJ; Jolley, KA; Williams, NJ; Corander, J; Sheppard, SK. Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. **Nat Commun**. Feb 3;12(1):765, 2021
- Maluta RP, Logue CM, Casas MR, Meng T, Guastalli EA, Rojas TC, et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extraintestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Plos One**.;9(8): 2014.
- Manges AR, Johnson JR. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectrum**. 3(5). 2015.
- Manges Ar, Smith Sp, Lau Bj, Nuval Cj, Eisenberg Jn, Dietrich Ps. Retail Meat Consumption And The Acquisition Of Antimicrobial Resistant *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infections: A Case–Control Study. **Foodborne Pathog Dis**;4:419–31.2007
- Manna, SK; Manna, C; Batabyal, K; Das, B; Golder, D; Chattopadhyay, S; Biswas, BK. Serogroup distribution and virulence characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* from food and cattle stool. **J Appl Microbiol**. 108, 658–665, 2010
- Mariani-Kurkdjian, P; Lemaitre, C; Bidet, P; Perez, D; Boggini, L; Kwon, T; Bonacorsi, S. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. **New Microbes New Infect**. Jul;2(4):127-31, 2014
- Markland, S. M., Lestrangle, K. J., Sharma, M., Kniel, K. E. Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. **Zoonoses and Public Health**, 62, 491–496. 2015
- Massella, E; Reid, CJ; Cummins, ML; Anantanawat, K; Zingali, T; Serraino, A; Piva, S; Giacometti, F; & Djordjevic, SP. Snapshot Study of Whole Genome Sequences of *Escherichia coli* from Healthy Companion Animals, Livestock, Wildlife, Humans and Food in Italy. **Antibiotics**. 9(11), 782, 2020.
- Matos, JGCN. Caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de enterobactérias isoladas de carcaças de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. **Tese (Doutorado em Microbiologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 139p. 2017
- Mcauley CM, Mcmillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence And Characterization Of Foodborne Pathogens From Australian Dairy Farm Environments. **J Dairy Sci** 97:7402–7412. 2014
- Meena, PR; Yadav, P; Hemlata, H;Tejavath, KK; Singh, AP. Poultry-origin extraintestinal *Escherichia coli* strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India. **J Appl Microbiol**. Oct 23, 2020

Mellata, M; Johnson, J R; Curtiss, R. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. **Zoonoses Public Health**.65:103–113. 2018

Mellata, M.; Dho-Moulin, M.; Dozois, C. M. ; Curtiss R.; Brown, P. K.; Arne, P.; Bree, A. ; Desautels, C. ; Fairbrother, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 536–540, 2003.

Meza-Segura, M; Zaidi, MB; Vera-Ponce de León, A; Moran-Garcia, N; Martinez-Romero, E; Nataro, JP; Estrada-Garcia, T. New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. **Front Cell Infect Microbiol**. Oct 15;10:572951, 2020

MilkPoint. 2020. O que nos reserva?. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/o-que-nos-reserva-o-futuro-213051/>. Acesso em: 27 de março de 2020

Mirsepasi-Lauridsen, HC; Vallance, BA; Krogfelt, KA; Petersen, AM. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Clin Microbiol Rev**. Apr; 32(2): e00060-18, 2019

Miyahira, RF; Santos, EA; Leão, RS; De Freitas-Almeida, AC; Queiroz, ML. Antimicrobial Susceptibility and Enterotoxin-Encoding Genes in Staphylococcus spp. Recovered from Kitchen Equipment from a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, p. 1-9, 2018

Miyahira, RF; Santos, EA; FREITAS-ALMEIDA, AC; QUEIROZ, MLP. Occurrence and antimicrobial resistance of Salmonella spp. and other enterobacteria recovered from kitchen equipment of a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Microbiol Res.**, v. 5, p. 467-471-471, 2013

Modgil, V; Mahindroo, J; Narayan, C; Kalia, M; Yousuf, M; Shahi, V; Koundal, M; Chaudhary, P; Jain, R; Sandha, KS; Tanwar, S; Gupta, P; Thakur, K; Singh, D; Gautam, N; Kakkar, M; Bharti, B; Mohan, B; Taneja, N. Comparative analysis of virulence determinants, phylogroups, and antibiotic susceptibility patterns of typical versus atypical Enterococcal *E. coli* in India. **PLoS Negl Trop Dis**. Nov 18; 14(11):e0008769, 2020

Montero , DA; Velasco, J; Del Canto, F; Puente, JL; Padola, NL; Rasko, DA; Farfán, M; Salazar, JC; Vidal, R. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin–producing *Escherichia coli* strains. **Sci. Rep.** 7, 701, 2017

Moreira da Silva, RCR; Martins Júnior, PO; Gonççalves, LF; Martins, VP; Melo, ABF; Pitondo-Silva, A; Campos, TA. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**. Jun; 9:61-67, 2017

Müller, A; Stephan, R; Nüesch-Inderbinnen, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. **Sci Total Environ**. 541:667–72, 2016

Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. Nov 20;282(5393):1494-7, 1998

Mulvey, MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology** 4(5), 257–271, 2002

Munkhdelger, Y; Gunregjav, N; Dorjpurev, A; Juniichiro, N; Sarantuya1, J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. **J Infect Dev Ctries**. 11(1):51-57. 2017

Nataro, JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**. Jan;21(1):4-8, 2005

Nataro, J. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, W. D. (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: **ASM Press**. p. 603–626. 2011

Nataro, JP; Seriwatana, J; Fasano, A; Maneval, DR; Guers, LD; Noriega, F; Dubovsky, F; Levine, MM; Morris Jr, JG. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infect Immun**; 63: 4721-4728. 1995

Nataro, J.P, Seriwatana J., Fasano A., Maneval D., Guers, L.D. Noriega F., Dubovsky F., Levine M.M, Morris jr. J.G. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Clin microbiol rev**, 1998

Nataro, J P, Kaper, J B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. p.142–201. Vol. 11, No. 1. Jan. 1998

Nataro J.P, Mai V., Johnson J., Blackwelder W.C., Heimer R., Tirrell S., Edberg S.C, Braden C.R., Glenn Morris J, Hirshon J.M.. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis**. 43:402–407. 2006.

Neter E, Westphal O, Lüderitz O, Gino Rm, Gorzynski Ea Demonstration Of Antibodies Against Enteropathogenic *Escherichia Coli* In Sera Of Children Of Various Ages. **Pediatrics** 16:801–808. 1955

Nordstrom, L; Liu, CM and Price1, LB. Foodborne urinary tract infections: A new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Frontiers in Microbiology** Vol 4:29. March 2013

Ntuli, V; Njage, PMK; Buys, EM. “Extended-spectrum β -lactamase, shigatoxin and haemolysis capacity of O157 and non-O157 *E. coli* serotypes from producer-distributor bulk milk,” **Int Dairy J**, vol. 66, pp. 126–134, 2017.

Oliveira, MAS; Barauna, RA; Marcona, DJ; Lagoa, LAB; Silva, A; Lusio, J; Tavares, RDS; Tacaoc, M; Henriques, I; Schneider, MPC. Occurrence, antibiotic-resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) farmed in estuaries of Amazonia. **Marine Pollution Bulletin** 157:111-302. 2020

- Olmedo, LMB. Caracterização dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Escherichia coli* recuperadas de mariscos. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 104 p. 2016
- Otero, V; Rodríguez-Calleja, JM; Otero, A; García-López, ML; Santos, JA. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.** 79, 5864–5869, 2013
- Park Jh, Oh Ss, Oh Kh, Shin J, Jang Ej, Jun By, Youn Sk, Cho Sh Diarrheal Outbreak Caused By Atypical Enteropathogenic *Escherichia Coli* O157:H45 In South Korea. **Foodborne Pathog Dis** 11:775–781. 2014
- 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.** 36: 598-602, 1998
- Pavlickova, S; Dolezalova, M; Holko, I. Resistance and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from chicken. **J Environ Sci Health.** 50(6):417-21. 2015
- Pennington, H. *Escherichia coli* O157. **Lancet** 376:1428–1435. 2010
- Pieniz, S; Rodrigues, DF; Arndt, RN; Mello, JF; Rodrigues, KL; Andrezza, R; Camargo, FAO; Brandelli, A. Molecular identification and microbiological evaluation of isolates from equipments and food contact surfaces in a hospital Food and Nutrition Unit. **Braz. J. Biol.** vol. 79, no. 2, pp. 191-200, 2019
- Pinaud, L; Sansonetti, PJ; Phalipon, A. Host Cell Targeting by Enteropathogenic Bacteria T3SS Effectors. **Trends Microbiol.** Apr;26(4):266-283, 2018
- Poolman, JT; Wacker, M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. **J Infect Dis.** Jan 1;213(1):6-13, 2016
- Prakasan, S; Prabhakar, P; Lekshmi, M; Kumar, S; Nayak, BB. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring variant Shiga toxin genes from seafood. **Vet World.** Mar;11(3):379-385, 2018
- Prince-Guerra, JL; Nace, ME; Lyles, RH; de Aceituno, AMF; Bartz, FE; Arbogast, JW; Gentry-Shields, J; Jaykus, LA; Heredia, N; García, S; Leon, JS. Both Handwashing and an Alcohol-Based Hand Sanitizer Intervention Reduce Soil and Microbial Contamination on Farmworker Hands during Harvest, but Produce Type Matters. **Appl Environ Microbiol.** Sep 1;86(18):e00780-20. 2020
- Quadri F, Svennerholm A.M., Faruque A.S.G., Sack R.B.. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, Clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.** 18:465–483. 2005.

Ramchandani, M, Manges Ar, Debroy C, Smith Sp, Johnson Jr, Riley Lw. Possible Animal Origin Of Human-Associated, Multidrug- Resistant, Uropathogenic *Escherichia Coli*. **Clin Infect Dis**;40: 251–7. 2005.

Ranjbar, R; Masoudimanesh, M; Dehkordi, FS; Jonaidi-Jafari, N; Rahimi, E. Shiga (Vero)-toxin producing *Escherichia coli* isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. **Antimicrob Resist Infect Control**. 6:4, 2017

Ressurreição Brandão, MA; Lopes, ATS; Neta, MTS; Oliveira, RBF; Rezende, RP; Albuquerque, GR; Gonçalves, VD; Rodrigues, DP; Boehs, G; Maciel, BM. Microbiological Quality and Prevalence of b-Lactam Antibiotic Resistance Genes in Oysters (*Crassostrea rhizophorae*). **J Food Protect**. Vol. 80, No. 3, Pages 488–496, 2017

Ribeiro Júnior, JC; Silva, FF; Lima, JBA; Ossugui, EH; Teider Junior, PI; Campos, ACLP; Navarro, A; Tamanini, R; Ribeiro, J; Alfieri, AA; Beloti, V. Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses. **J. Dairy Sci**. 102:10850-10854. 2019

Riley, LW. Extraintestinal Foodborne Pathogens. **Annu Rev Food Sci Technol**. Mar 25;11:275-294, 2020

Robins-Browne¹, RM; Holt, KE; Ingle, DJ; Hocking, DM; Yang, J; Tauschek, M. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? **Front. Cell. Infect. Microbiol**. V. 6:14, 2016

Roth, F; Lessa, GC; Wild, C; Kikuchi, RKP; Naumann, MS. Impacts of a high-discharge submarine sewage outfall on water quality in the coastal zone of Salvador (Bahia, Brazil). **Mar Pollut Bull**. May 15;106(1-2):43-8, 2016

Sabaté, M; Moreno, E; Perez, T; Andreu, A; Prats, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin. Microbiol. Infect**. 12 (9):880–886, 2006

Sánchez, F; Fuenzalida, V; Ramos, R; Escobar, B; Neira, V; Borie, C; Lapierre, L; Venegas, L; Dettleff, P; Johnson, T; Fuentes-Castillo, D; Lincopan, N; Galarce, N. Genomic features and antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from food in Chile. **Zoonoses Public Health**. Feb 22, 2021

Santos, ACM; Santos, FF; Silva, RM; Gomes ,TAT. Diversity of Hybrid and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. **Front. Cell. Infect. Microbiol**. 10:339, 2020

Sarowska, J; Futoma-Koloch, B; Jama-Kmiecik, A; Frej-Madrzak, M; Ksiazczyk, M; Bugla-Ploskonska, G; Choroszy-Krol, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathog**. Feb 21;11:10, 2019

Scheinberg, JA; Dudley, EG; Campbell, J; Roberts, B; DiMarzio, M; DebRoy, C; Cutter, C. N. Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Escherichia coli* and Hygiene Indicator

Bacteria Isolated from Leafy Green Produce, Beef, and Pork Obtained from Farmers' Markets in Pennsylvania. **J Food Prot.**, 80(2), 237–244, 2017

Schmidt, CE; Shringi, S; Besser, TE. Protozoan Predation of *Escherichia coli* O157:H7 Is Unaffected by the Carriage of Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages. **PLoS One.** 11(1): e0147270, 2016

Secretaria de vigilância em saúde - Ministério da Saúde (SVS/MS). **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos.** 2013;1-23, 2013

Shakerian, A; Rahimi, E; Emad, PJ. Vegetables and Restaurant Salads as a Reservoir for Shiga Toxigenic *Escherichia coli*: Distribution of Virulence Factors, O-Serogroups, and Antibiotic Resistance Properties. **Food Prot.** v. 79, n. 7, 1154-1160, 2016

Sheng, L; Rasco, B; Zhu, MJ. Cinnamon Oil Inhibits Shiga Toxin Type 2 Phage Induction and Shiga Toxin Type 2 Production in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol.** Oct 27;82(22):6531-6540, 2016

Shridhar PB, Patel IR, Gangiredla J, Noll LW, Shi X, Bai J, Elkins CA, Strockbine NA and Nagaraja TG. Genetic Analysis of Virulence Potential of *Escherichia coli* O104 Serotypes Isolated From Cattle Feces Using Whole Genome Sequencing. **Front. Microbiol.** 9:341. 2018

Shridhar, PB; Patel, IR; Gangiredla, J; Noll, LW; Shi, X; Bai, J; Nagaraja, TG. DNA Microarray-Based Genomic Characterization of the Pathotypes of *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, and O145 Isolated from Feces of Feedlot Cattle. **J Food Prot.** v. 82, n. 3, 395–404, 2019

Silva, MLD; Sales, A; Martins, S; Castro, RO; Araújo, FV. The influence of the intensity of use, rainfall and location in the amount of marine debris in four beaches in Niterói, Brazil: Sossego, Camboinhas, Charitas and Flechas. **Marine Pollution Bulletin.** 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.061>

Silva ZN , Cunha AS, Lins MC, Carneiro LAM, Almeida ACF, Queiroz MLP. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Rev Saúde Pública.** 35(4):375-9, 2001

Singer, RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. **Front Microbiol.** Feb 4;6:28, 2015

Singh P, Sha Q, Lacher Dw, Del Valle J, Mosci Re, Moore Ja, Scrib-Ner Kt, Manning, Sd. Characterization Of Enteropathogenic And Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* In Cattle And Deer In A Shared Agroecosystem. **Front Cell Infect Microbiol** 5:29. 2015

Song, Z; Zuo, L; Li, C; Tian, Y; Wang, H. Copper Ions Facilitate the Conjugative Transfer of SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Across Bacterial Genera. **Front Microbiol.** Feb 2;11:616792, 2021

Spano, LC; da Cunha, KF; Monfardini, MV; Fonseca, RCB; Scaletsky, ICA. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect Dis.** 17: 773, 2017

Spurbeck, RR; Dinh, PC; Walk, ST; Stapleton, AE; Hooton, TM; Nolan, LK; Kim, KS; Johnson, JR; Mobley, HLT. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. **Infect. Immun.** 80:4115–4122. 2012

Stoppe, NC; Silva, JS; Carlos, C; Sato, MIZ; Saraiva, AM; Ottoboni, LMM; Torres, TT. Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates **Front Microbiol.** 8:2512. 2017

Subashchandrabose, S and. Mobley, HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr.** August 3(4). 2015

Taban BM, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? **Anaerobe.** Dec;17(6):286-7. 2011

Tian L., Zhu X., Chen Z., Liu W., Li S., Yu W., Zhang W., Xiang X., Sun Z.. Characteristics of bacterial pathogens Associated with acute diarrhea in children Under 5 years of age: a hospital-based Cross-sectional study. **BMC infectious diseases.** 16:253, 2016.

Tondo, EC., Casarin, LS., Oliveira, AB., Martello, L., Silva Jr., E.A., Gelli, D. Advances in food safety in Brazil (Avanços da segurança de alimentos no Brasil). **Vigilância Sanitária em Debate**, 3: 122–130. 2015.

Toro, M; Rivera, D; Jiménez, MF; Díaz, L; Navarrete, P; 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** 75, 55-60. 2018

Torres, AG; Payne, SM. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 825-833, 1997.

Torres , AG; Amaral, MM; Bentancor, L; Galli, L; Goldstein, J; Krüger, A; Rojas-Lopez, M. Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. **Microorganisms.** Sep 28;6(4):100, 2018

United States Department of Agriculture (USDA), Food safety and Inspection Service, 2012. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products. U.S. Disponível em: www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf. Acesso em: 27 de abril de 2019

Van der Woude, M; Henderson, IR. Regulation and Function of Ag43 (Flu). **Annu. Rev. Microbiol.** 62:153–69, 2008

Van, TTH; Chin, J; Chapman, T; Tran, LT; Coloe, PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **Int J Food Microbiol.** 124, 217–223, 2008

Veiga, EOB. Qualidade microbiológica e Físico-química de salsa inteira e minimamente processada comercializada no Noroeste Fluminense. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Instituto Federal Fluminense – Campus Bom Jesus do Itabapoana. Bom Jesus do Itabapoana- RJ. 83 p. 2014

Vincent, C; Boerlin, P; Daignault, D; Dozois, CM; Dutil, L; Galanakis, C; Reid-Smith, RJ; Tellier, PP; Tellis, PA; Ziebell, K; Manges, AR. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections . **Emerg Infect Dis.** v. 16, n. 1, Jan, 2010

Waksman, G and Hultgren, SJ. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. **Nat Rev Microbiol.** 7(11): 765–774. November 2009

Walker, TJ; Bachoon, DS; Otero, E; Ramsubhag, A. Detection of verotoxin producing *Escherichia coli* in marine environments of the Caribbean. *Mar Pollut Bull.*, 76(1-2), 406–410, 2013

Wasilenko , JL; Fratamico, PM; Sommers, C; DeMarco, DR; Varkey, S; Rhoden, K; 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. **Front Cell Infect Microbiol.** Jun 18; 4:81, 2014

Wasiński, B. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections. **Ann Agric Environ Med.** v. 26, n. 4, 532–537, 2019

Wiles, TJ.; Kulesus, RR and. Mulvey ,MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol.**; 85(1): 11–19. August, 2008

World Health Organization (WHO). **Estimates Of The Global Burden Of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015**, 2015.

World Health Organization (WHO). **Food safety and foodborne illness.** Geneva, 2007

Xia, X; Meng, J; McDermott, PF; Zhao, S. *Escherichia coli* from retail meats carry genes associated with uropathogenic *Escherichia coli*, but are weakly invasive in human bladder cell culture. **J Appl Microbiol.** 110, 1166–1176, 2011

Yamaji, R; Friedman, CR; Rubin, J; Suh, J; Thys, E; McDermott, P; Hung-Fan, M; Riley, LW. A Population-Based Surveillance Study of Shared Genotypes of *Escherichia coli* Isolates from Retail Meat and Suspected Cases of Urinary Tract Infections. **mSphere.** Aug 15; 3(4):e00179-18, 2018

APÊNDICE A - Origem, localidade e ano de isolamento das cepas de *Escherichia coli* recuperadas de alimentos

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
1i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
2i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
3i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
4i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
5i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
6i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
7i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
8i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
9i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
10i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
11i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
12i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
13i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
14i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
15i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
16i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
17i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
18i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
19i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
20i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
21i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
22i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
23i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
24i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
25i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
26i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013

APÊNDICE A: Origem, localidade e ano de isolamento das cepas de *Escherichia coli* recuperadas de alimentos (Continua)

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
27i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
28i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
29i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
30i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
31i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
32i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
33i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
34i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
35i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
36i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
37i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
38i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
39i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
40i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
41i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
42i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
43i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
44i	Salsa	<i>In natura</i>	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
1MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
2MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
3MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
4MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
5MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
6MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
7MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
8MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
9MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
10MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
11MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
12MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
13MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
14MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
15MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
16MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
17MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
18MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
19MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
20MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2013
21MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
22MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
23MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
24MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
25MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
26MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
27MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
28MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
29MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
30MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
31MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
32MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
33MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
34MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
35MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
36MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
37MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
38MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
39MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
40MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
41MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
42MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
43MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
44MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
45MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
46MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
47MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
48MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
49MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
50MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
51MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
52MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
53MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
54MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
55MP	Salsa	Minimamente Processada	Comércio varejista do município de Bom Jesus do Itabapoana/RJ	2014
FG1	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG2	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG3	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG4	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG5	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG6	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG7	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG8	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
FG9	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG10	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG11	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG12	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG13	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG14	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG15	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG16	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG17	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG18	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG19	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG20	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG21	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG22	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG23	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG24	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG25	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG26	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG27	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG28	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG29	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG30	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG31	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG32	Frango	Tradicional	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG33	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG34	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG35	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
FG36	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG37	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG38	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG39	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG40	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG41	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG42	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG43	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG44	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG45	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG46	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG47	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG48	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG49	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG50	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG51	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG52	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG53	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG54	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG55	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG56	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG57	Frango	Tipo Exportação	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FG58	Frango	Orgânico	Comércio varejista do município do Rio de Janeiro/RJ	2013/2014
FM1	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM2	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM3	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM4	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
FM5	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM6	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM7	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM8	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM9	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM10	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM11	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM12	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM13	Frutos do Mar	Siri catado	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM14	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM15	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM16	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM17	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM18	Frutos do Mar	Chumbinho	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM19	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM20	Frutos do Mar	Sururu	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM21	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM22	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM23	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM24	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM25	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM26	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM27	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM28	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM29	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM30	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM31	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
FM32	Frutos do Mar	Camarão	Comércio varejista do município de Salvador/BA	2014
FM33	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM34	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM35	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM36	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM37	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM38	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM39	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM40	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM41	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM42	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM43	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM44	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM45	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM46	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM47	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM48	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM49	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM50	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM51	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM52	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM53	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM54	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM55	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM56	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM57	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
FM85	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM86	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM87	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM88	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM89	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM90	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM91	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM92	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM93	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM94	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM95	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM96	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM97	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM98	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
FM99	Frutos do Mar	Ostra	Fazendas de Osteicultura da região do Baixo Sul da Baía de Todos os Santos/BA	2012
MX1	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX2	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX3	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX4	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX5	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX6	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX7	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX8	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX9	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX10	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX11	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX12	Frutos do Mar	Aferventado	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
MX13	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX14	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX15	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX16	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX17	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX18	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX19	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX20	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX21	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX22	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX23	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX24	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX25	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX26	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX27	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX28	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX29	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX30	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX31	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX32	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX33	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX34	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX35	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX36	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX37	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX38	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX39	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
MX40	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX41	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX42	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX43	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX44	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX45	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX46	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX47	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX48	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX49	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX50	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX51	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX52	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX53	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX54	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX55	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX56	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX57	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX58	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX59	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX60	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX61	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX62	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX63	Frutos do Mar	<i>In natura</i>	Costa da praia de Itaipu, Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX64	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX65	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX66	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013

APÊNDICE A: Continuação

Cepa	Origem	Característica da Amostra	Localidade	Ano de isolamento
MX67	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX68	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
MX69	Frutos do Mar	Comercializado	Comércio varejista do Município de Niterói/RJ	2012/2013
PB1	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB2	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB3	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB4	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB6	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB7	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB8	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB9	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
PB10	Dieta Hospitalar	Purê de batatas	Hospital Universitário no município do Rio de Janeiro/RJ	2011
LP1	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP2	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP3	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP4	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP5	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP6	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP7	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP8	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP9	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP10	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015
LP11	Leite de vaca	Leite Pasteurizado Tipo A	Comércio varejista da Região Metropolitana do município do Rio de Janeiro/RJ	2015

APÊNDICE B - Resumo apresentado no Congresso Latinoamericano de Microbiologia 2018

29/05/2018

Abstract Preview



XXIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
 XL CONGRESO CHILENO DE MICROBIOLOGÍA
 Centro de Eventos y Convenciones Centroparque
 Parque Araucano, Santiago, Chile
 13 al 16 de noviembre de 2018

Ocorrência do gene *stx2* em cepas de *Escherichia coli* isoladas de preparação purê de batatas destinada a pacientes internados em um hospital universitário na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Chaves Carolina Relvas^{1,2}, Gomes Ohana Cardoso¹, Andrade João Ramos C.¹, Queiroz Mara Lúcia Penna¹

(1) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BR

(2) Campus Campos Guarus, Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Fluminense

Alimentos prontos para consumo estão implicados na veiculação de microrganismos com potencial patogênico. A *Escherichia coli*, pertence à microbiota intestinal dos seres humanos e animais é importante indicador de contaminação fecal recente e de condições insatisfatórias de higiene no preparo dos alimentos. O subgrupo das *E. coli* diarreio gênicas, possui atributos de virulência que possibilitam o envolvimento na etiologia de doenças gastrointestinais causadas por água e alimentos. As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) merecem destaque por serem importantes patógenos alimentares emergentes, associados a surtos e a casos isolados, que podem compreender desde diarreias não complicadas à colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica (HUS). O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de genes de virulência relacionados à STEC e determinar o grupo filogenético em cepas de *E. coli* previamente isoladas da preparação de purê de batatas da dieta elaborada na cozinha de um hospital universitário no Rio de Janeiro. A escolha desta guarnição se deveu ao fato de ter boa aceitação pelos pacientes e por ser geralmente prescrita àqueles acometidos por patologias mais severas, bem como aos idosos e às crianças, devido a sua consistência pastosa. A presença dos genes relacionados à STEC, *stx1*, *stx2* e *eae*, e à pesquisa do grupo filogenético, *chuA*, *yjaA* e do fragmento TspE4C2, foi determinada por ensaios de PCR (reação em cadeia da polimerase). Os resultados obtidos mostraram que 88,9% (n=8) das cepas isoladas eram STEC pois apresentaram o gene *stx2* isoladamente. Os genes *stx1* e *eae* não foram encontrados. Todas as cepas de *E. coli* (n=9) foram pertencentes ao grupo filogenético A. Estes resultados implicam a preparação de purê de batatas como veículo de disseminação de STEC aos pacientes internados no hospital e o grupo filogenético A, relacionado a cepas comensais, sugere possível contaminação proveniente de condições inadequadas de higiene na manipulação do alimento.

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)