

**MALLU JAGNOW SERENO**

**PRESENÇA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM BOVINOS  
PROVENIENTES DE CRIAÇÕES EXTENSIVA E INTENSIVA E NA LINHA DE  
ABATE E PROCESSAMENTO**

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

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

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

T

S483p  
2021  
Sereno, Mallu Jagnow, 1991-  
Presença de *Escherichia coli* diarreiogênicas em bovinos  
provenientes de criações extensiva e intensiva e na linha de abate  
e processamento [recurso eletrônico] / Mallu Jagnow Sereno. –  
Viçosa, MG, 2021.

1 tese eletrônica (88 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-86.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.027>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos de corte - Criação. 2. Alimentos -  
Microbiologia. 3. Carne de boi. 4. *Escherichia coli*. 5.  
Matadouros. 6. Virulência. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.213

**MALLU JAGNOW SERENO**

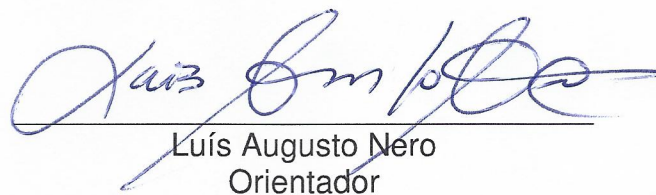
**PRESENÇA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM BOVINOS  
PROVENIENTES DE CRIAÇÕES EXTENSIVA E INTENSIVA E NA LINHA DE  
ABATE E PROCESSAMENTO**

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

APROVADA: 03 de agosto de 2021.

Assentimento:

  
Mallu Jagnow Sereno  
Autora

  
Luís Augusto Nero  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Sou muito grata a todas as pessoas que, de alguma forma, me apoiaram e me orientaram durante mais essa etapa, emocionalmente e profissionalmente. Sou muito grata a Deus que, por meio da minha fé, sei que esteve ao meu lado não para evitar os desafios, as incertezas e os medos, mas sim para me guiar, fortalecer e me fazer crescer durante todo o processo.

Agradeço aos meus pais Orlei e Tânia, à minha irmã Vanessa, ao meu sobrinho Joaquim, e ao meu namorado Daniel, pelo apoio, pela enorme paciência nos momentos de “surto”, por entender a ausência nos momentos em que foi necessária dedicação exclusiva aos estudos. Obrigada por todo amor, carinho, incentivo e compreensão! E a toda minha família, pela união e por torcerem por mim.

À minha amiga Cibeli, meu ponto de apoio emocional e profissional, quer seja dos Estados Unidos quer seja em estados/cidades diferentes. Obrigada por acreditar em mim, por sempre me fazer ver o lado positivo em qualquer situação, por se fazer presente e continuar me entendendo e acertando nos conselhos. Obrigada pelo companheirismo e amizade que foi além do meio acadêmico.

Agradeço a todas as pessoas especiais que conheci durante minha passagem por Viçosa. À Universidade Federal de Viçosa e aos funcionários do Departamento de Veterinária, especialmente ao Dagô, ao Sr. Luís e à Rosi. A todos colegas do Laboratório InsPOA, em especial Mili, Bruna, Ju, Rafa, Lorena, Mirian, Thaiza, Frida, e as “agregadas” Vivi e Laura, obrigada pelos momentos vividos, pelo conhecimento compartilhado e por tornar mais leve a distância da família. Um agradecimento especial à minha colega de apartamento Gislaíne, que se tornou uma pessoa muito especial na minha vida, uma verdadeira irmã.

Gostaria de deixar minha gratidão à equipe do LACOMA-UFPR, do SOAP-UNESP e do IBTEC-UNESP pelo apoio durante as coletas das amostras e análises laboratoriais, em especial a Jhennifer, a Carol, a Manu, ao Victor e a Aryele, que abraçaram o projeto e não mediram esforços em me ajudar, sendo essenciais no planejamento, na obtenção e no processamento das amostras. Um destaque importante no meu agradecimento à Aryele, que me abrigou durante minha passagem por Botucatu. Foram literalmente 24 h de convivência intensa por dois meses e meio. Sou muito grata por ter me acolhido e me ajudado, mas

principalmente pela amiga que você se tornou. Ao professor João Pessoa Araujo Junior e ao Fábio Sossai Possebon por disponibilizar o laboratório, sua estrutura e material necessário, para realização de etapas importantes desta pesquisa.

Um agradecimento especial ao professor Luís Augusto Nero, obrigada pelo suporte como meu orientador, pela ajuda no delineamento do projeto e durante o tempo de pesquisa e redação desta tese, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e pela compreensão durante as intempéries do doutorado. Foi uma honra trabalhar sob sua orientação.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite, dispondo de tempo para leitura e para defesa deste trabalho. Ao professor Luciano dos Santos Bersot, agradeço por todo apoio intelectual, pela parceria no projeto e por disponibilizar o laboratório para a realização de importantes etapas deste trabalho. Ainda, meu agradecimento se estende a todos esses anos em que sua contribuição e apoio tem sido de extrema importância na minha formação profissional e construção pessoal. Sou grata por ter visto em mim algum potencial a ser explorado, pelas oportunidades de estágios, pela orientação na residência e no mestrado. Sempre foi um privilégio poder trabalhar, aprender e crescer no LACOMA e na UFPR.

Ao professor Juliano Gonçalves Pereira que, além de toda contribuição científica e amizade no tempo em que atuou como professor substituto na UFPR no meu tempo de graduação, teve grande importância ao longo de toda jornada na pós-graduação, assim como pela parceria no projeto e por disponibilizar também o laboratório para a realização de importantes etapas deste trabalho. Ao professor Ricardo Seiti Yamatogi, obrigada por compartilhar suas ideias e pelas várias vezes que me “salvou” com o trabalho de pesquisa, obrigada pelo seu apoio e sua paciência, que não foi pouca. Ao professor Wladimir Padilha da Silva, que também participa do “projeto” o qual esta pesquisa faz parte, obrigada por compartilhar seus conhecimentos científicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por viabilizar a execução do projeto através do financiamento concedido via Chamada CNPq/MS-SCTIE - Decit Nº 01/2018 e Chamada Universal MCTIC/CNPq nº 28/2018. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo subsídio da minha bolsa de doutorado.

A todos muito obrigada!

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade"

Marie Curie

## RESUMO

SERENO, Mallu Jagnow, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Presença de *Escherichia coli* diarreiogênica em bovinos provenientes de criações extensiva e intensiva e na linha de abate e processamento.** Orientador: Luís Augusto Nero.

Embora *Escherichia coli* faça parte da microbiota comensal do trato intestinal humano e animal, alguns patótipos denominados genericamente como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) podem causar infecções intestinais. Animais de produção, principalmente os bovinos, são considerados reservatórios naturais de DEC e a principal fonte de contaminação de alimentos. Nos abatedouros, DEC pode ser transferida para carcaças durante o abate e, subsequentemente, para o produto final durante o processamento. Assim, esses produtos podem atuar como potenciais veículos de transmissão de DEC para humanos. Este estudo teve como objetivo avaliar a presença de *E. coli* patogênica em bovinos provenientes de dois sistemas de criação (extensivo e intensivo) e em abatedouros frigoríficos de bovinos, bem como identificar *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e demais patótipos (*E. coli* enteroinvasiva, EIEC, *E. coli* enteropatogênica, EPEC, *E. coli* enterotoxigênica, ETEC e *E. coli* enteroagregativa, EAEC). Amostras de bovinos (cem animais de cada sistema de criação) foram obtidas em diferentes etapas do abate: amostras de carcaças, coletadas após sangria (n = 200), após evisceração (n = 200) e após lavagem final (n = 200), e amostras de fezes (n = 200), coletadas imediatamente antes da etapa de oclusão do reto. Ainda, foram obtidas amostras de água industrial (n = 10) e água residual proveniente da lavagem final das carcaças (n = 10), e amostras de cortes cárneos (n = 90). Todas amostras foram submetidas ao isolamento de *E. coli* com base na metodologia ISO 13136 e através de isolamento em ágar MacConkey. Isolados identificados como DEC (n = 270) foram submetidos à caracterização de acordo com determinantes genéticos de virulência e à determinação do grupo filogenético. Das 910 amostras coletadas, 94 (10,3%) foram positivas para algum tipo de DEC, das quais 82 foram amostras de fezes dos animais abatidos e doze de carcaças, especialmente após a sangria. Amostras de cortes cárneos e de água não apresentaram DEC. Dessas 94 amostras positivas, 81 amostras foram positivas para STEC, oito amostras foram positivas para EIEC e cinco amostras positivas para EPEC. A partir das frequências de DEC nos bovinos

amostrados, animais criados em sistema extensivo apresentaram maior frequência de STEC (n = 48, 48,0%) quando comparados a animais criados em sistema intensivo (n = 23, 23,0%) ( $p < 0,05$ ). Com relação aos demais patótipos isolados, EPEC e EIEC, não foram observadas diferenças significativas entre os sistemas de produção em relação as frequências de bovinos positivos ( $p > 0,05$ ). Entre os isolados obtidos, o patótipo mais isolado foi STEC (n = 251, 93,0%), seguido de EPEC (n = 11, 4,0%) e EIEC (n = 08, 3,0%); nenhum isolado de DEC foi caracterizado como EAEC ou ETEC. De acordo com a caracterização dos isolados de STEC, três (1,2%) carregavam o gene *stx1*, 148 (59,0%) carregavam o gene *stx2* e 85 (33,9%) carregavam ambos *stx1* e *stx2*; 22 (8,8%) isolados apresentaram o gene *eae*. Todas as EPEC isoladas foram classificadas como EPEC atípicas. O grupo filogenético mais frequente foi o filogrupo B1, seguido pelo filogrupo E. Este estudo fornece evidências adicionais de que os bovinos são fontes potenciais de DEC. A detecção de *E. coli* patogênica em fezes e carcaças de bovinos associado a não detecção em amostras de cortes finais sugere que procedimentos adequados durante o abate e processamento da carne podem desempenhar um papel importante no seu controle. Os bovinos de ambos os sistemas de produção apresentaram DEC, no entanto, foi possível verificar uma influência do sistema extensivo no isolamento de STEC. Os isolados obtidos nesta pesquisa, sobretudo STEC, apresentaram importantes fatores de virulência, destacando o alto potencial de patogenicidade dessas cepas e reforçando a importância do controle e monitoramento de DEC, no campo e em abatedouro de bovinos, visando minimizar a contaminação de produtos finais. Mais estudos são necessários para determinar os fatores que influenciam a prevalência de STEC em bovinos, os quais auxiliarão no desenvolvimento de estratégias em toda a cadeia para controlar o risco de exposição da carne a cepas relevantes que podem ocasionar quadros clínicos graves em humanos.

Palavras-chave: APPCC. BPF. Carne bovina. *E. coli* enterohemorrágica. Gado. Microbiota. Sistema de produção.



## ABSTRACT

SERENO, Mallu Jagnow, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021. **Presence of diarrheagenic *Escherichia coli* in cattle from extensive and intensive breeding and in the slaughter and processing line.** Advisor: Luís Augusto Nero.

Although *Escherichia coli* can be an innocuous resident of the human and animal intestinal tract, there are some strains generically named as diarrheagenic *E. coli* (DEC) able to cause significant diarrhea. Animal production, mainly cattle, is considered natural reservoirs of DEC and it can play an important role in food contamination. Once in the processing facilities, DEC can be spread to carcasses during the slaughtering procedures and, subsequently, it can contaminate the end products. Then, these products will act potentially as transmission vehicles for these pathogens to humans. This study aimed to evaluate the presence of DEC in two cattle breeding systems (extensive and intensive) and in slaughterhouses, and to identify Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and other pathotypes (enteroinvasive *E. coli*, EIEC, enteropathogenic *E. coli*, EPEC, enterotoxigenic *E. coli*, ETEC and enteroaggregative *E. coli*, EAEC). Bovine samples (one hundred animals from each breeding system) were obtained at different stages of slaughter: carcass samples, collected after bleeding (n = 200), after evisceration (n = 200) and after final washing (n = 200), and fecal samples (n = 200), collected immediately before the rectum occlusion. Industrial water samples (n = 10) and residual water from the carcass final washing (n = 10), and samples of meat cuts (n = 90) were also collected. All samples were submitted to *E. coli* isolation based on the ISO 13136 methodology and through isolation on MacConkey agar. Isolates identified as DEC (n = 270) were submitted to characterization according to genetic determinants of virulence and to the determination of the phylogenetic group. From 910 samples analyzed, 94 (10.3%) were positive for some pathotype of DEC, which 82 of the samples were feces of slaughtered animal and 12 were carcass, especially after bleeding stage. No meat cuts and water samples were positive for DEC pathotypes. Of these 94 positive samples, 81 samples were STEC positive, eight samples were EIEC positive, and five samples were EPEC positive. Analyzing the DEC frequencies in bovines, animals raised in extensive system had a higher frequency of STEC (n = 48, 48.0%) compared to animals reared in an intensive system (n = 23, 23.0%) (p < 0.05).

Regarding other pathotypes isolated, EPEC and EIEC, no significant differences were observed between the production systems and the frequencies of positive bovines ( $p > 0.05$ ). Among the isolates obtained, STEC was the main pathotype isolated ( $n = 251$ , 93.0%), followed by EPEC ( $n = 11$ , 4.0%) and EIEC ( $n = 08$ , 3.0%); no DEC isolates were characterized as EAEC or ETEC. According to the DEC characterization, three (1.2%) isolates presented the *stx1* gene, 148 (59.0%) presented the *stx2* gene and 85 (33.9%) presented both *stx1* and *stx2*; 22 (8.8%) presented the *eae* gene. All EPEC isolated were classified as atypical EPEC. The mainly phylogenetic group detected was filogroup B1, followed by filogroup E. This study provides further evidence that cattle are potential sources of DEC. Although pathogenic *E. coli* was detected in bovine feces and carcasses, it was not detected in final cut samples, suggesting that adequate procedures during slaughter and meat processing play an important role in its control. Both production systems presented cattle carrying DEC, however, it was possible to verify an influence of the extensive system in the isolation of STEC. The isolates obtained, especially STEC, presented important virulence factors, highlighting the pathogenicity of these strains and reinforcing the DEC control and monitoring importance, on farms and in bovine slaughterhouses, in order to minimize the contamination of final products. Further studies need to be done to determine the factors that can contribute with the prevalence of STEC in cattle to assist in the development of strategies throughout the production chain in order to control the risk of meat exposure to relevant strains that can cause severe clinical conditions in humans.

Keywords: HACCP. GMP. Beef. Enterohemorrhagic *E. coli*. Cattle. Microbiota. Bovine production system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação da interação de cada <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica com a célula-alvo típica.....	18
<b>Figura 2</b> – Estrutura genética da ilha de patogenicidade <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> . ....	21
<b>Figura 3</b> – Formação do pedestal e destruição da arquitetura das microvilosidades intestinais decorrente da lesão <i>Attaching and Effacing</i> . ....	22
<b>Figura 4</b> – Distribuição das fazendas de criação bovina amostradas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. ....	42
<b>Figura 5</b> – Amostras coletadas em dois abatedouros frigoríficos de bovinos entre maio e setembro de 2019.....	43
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática dos pontos coletados nas carcaças bovinas antes (A) e após (B) separação em meias carcaças, com a indicação dos locais amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm <sup>2</sup> . ...	44
<b>Figura 7</b> – Frequências de grupo filogenético de isolados de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica obtidos de diferentes amostras de dois abatedouros frigoríficos de bovinos localizados em São Paulo e Mato Grosso do Sul de acordo com Clermont et al. (2013). ....	53

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Testes bioquímicos utilizados para identificação e confirmação de <i>Escherichia coli</i> .....	46
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Taxa de contaminação por <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga em carne bovina e produtos cárneos de origem bovina em diferentes países.....	30
<b>Tabela 2</b> – Frequência de <i>Escherichia coli</i> patogênica de acordo com o tipo de amostra coletada em frigoríficos de bovinos em dois abatedouros frigoríficos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.....	50
<b>Tabela 3</b> – Comparação das frequências de <i>Escherichia coli</i> patogênica entre diferentes sistemas de criação de bovinos em amostras obtidas em abatedouros frigoríficos no Brasil.....	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICA .....	17
2.2. OCORRÊNCIA DE <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICA NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE BOVINA .....	25
2.3. CONTROLE DE <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICA.....	31
2.3.1. Produção primária .....	32
2.3.2. Abate e processamento industrial.....	36
2.3.3. Consumidores.....	37
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS.....	42
4.2. DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA .....	44
4.3. DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICA.....	45
4.4. CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> .....	45
4.4.1 Confirmação de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga.....	46
4.4.2 Confirmação de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica .....	47
4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE EPEC E STEC.....	47
4.6. GRUPO FILOGENÉTICO .....	48
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A – Primers, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado de PCR usados para caracterizar isolados diarreio gênicos de <i>E. coli</i> obtidos em diferentes locais da cadeia produtiva de carne bovina. ....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO B – Árvore decisória proposta para classificação dos filogrupos genéticos de <i>E. coli</i> por Clermont et al. (2013).....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e tem como habitat primário a microbiota do trato intestinal de animais e humanos, onde desempenha um papel importante em sua fisiologia. No entanto, adaptações envolvendo transmissão, aquisição e eliminação de elementos genéticos entre linhagens de *E. coli* e outros microrganismos, permitiram sua sobrevivência a novos ambientes e, em alguns casos, podem causar doenças graves em seus hospedeiros. A patogenicidade de *E. coli* é um mecanismo multifatorial e complexo, que envolve um grande número de fatores de virulência, como toxinas e adesinas, codificadas por genes cromossomais e por genes localizados em elementos genéticos móveis como os *transposons*, bacteriófagos e plasmídeos (FRAZÃO et al., 2019; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Algumas dessas linhagens patogênicas de *E. coli* podem causar infecções no trato intestinal (*E. coli* diarreiogênica, DEC) e infecções extraintestinais, como infecção urinária, sepse e meningite (MENG et al., 2013). O grupo de DEC é um dos principais causadores de doenças decorrente da ingestão de alimentos contaminados em todo o mundo, afetando todas as faixas etárias com sintomas que incluem, entre outros, diarreia, gastroenterite, inflamação e má absorção de nutrientes (CROXEN et al., 2013; LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013). Recém-nascidos, bebês, idosos e indivíduos com imunidade comprometida, como aqueles que vivem com o vírus da imunodeficiência humana, são os que apresentam maior risco de desenvolver o quadro clínico podendo levar a morte (ACOSTA et al., 2016; KOTLOFF et al., 2013).

Enterocolites causadas por *E. coli* ocorrem mais frequentemente em países menos desenvolvidos, sendo a falta e/ou a precariedade do saneamento básico consideradas os principais fatores responsáveis pela prevalência endêmica de DEC nesses locais. No entanto, surtos recorrentes de DEC também são frequentemente relatados em países desenvolvidos, onde se atribui como fator de risco a contaminação cruzada de alimentos ao longo da cadeia produtiva altamente internacionalizada, envolvendo intensa mecanização em grandes centros de processamento e distribuição de alimentos (AIJUKA; BUYS, 2019; RASKO et al., 2011).

O grupo de DEC pode ser classificado basicamente em seis patotipos, sendo que o patotipo de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) se destaca pela capacidade de causar complicações graves, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica, que pode determinar o óbito das pessoas acometidas. Outros sintomas de infecção por STEC incluem diarreia aquosa, diarreia com sangue e colite hemorrágica. A patogenicidade causada por STEC é mediada por genes que expressam toxinas Shiga (Stx), genes presentes na ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), bem como outros genes capazes de codificar fatores de virulência (BOLTON, 2011). Embora indivíduos de todas as idades estejam sob risco de infecção por STEC, crianças menores de cinco anos e idosos têm maior probabilidade de sofrer complicações graves, podendo resultar em óbitos (MCADAM, 2015).

Animais ruminantes domésticos e silvestres, principalmente bovinos, são considerados reservatórios naturais de *E. coli* patogênica e a principal fonte de contaminação de alimentos, que pode ocorrer após contaminação fecal direta ou indireta. Esses animais podem ser contaminados por esses microrganismos e transportá-los no trato intestinal como assintomáticos. Uma vez no ambiente de abate e processamento, os microrganismos podem se disseminar e contaminar o produto final. Assim, as carnes no varejo derivadas desses animais podem atuar como potenciais veículos de transmissão para humanos (ISLAM et al., 2008; XIA et al., 2010).

Desta forma, o sistema de produção de gado desempenha um papel importante na rota de contaminação de produtos cárneos com *E. coli* patogênica entérica. A maneira como o gado é criado pode modular a microbiota predominante e atuar como um fator para a seleção e disseminação desses patógenos. O gado em pastagem pode ficar mais exposto a efluentes de esgotos, alimentos e água contaminados e ser mais suscetível à contaminação por animais selvagens. Já no sistema intensivo de produção, a concentração de animais eleva o acúmulo de dejetos e a presença de microrganismos no ambiente do confinamento. Em razão da grande aproximação dos animais durante o regime intensivo, os couros estão mais susceptíveis a acumular grandes quantidades de material fecal em comparação com animais submetidos ao regime extensivo. Assim, animais criados sob sistema intensivo podem, teoricamente, carrear uma maior carga microbiana para o abate



quando comparado a animais criados sob sistema extensivo, o que aumenta o risco de contaminação da carcaça (GOMES et al., 2016; JARDIM et al., 2006).

Nos abatedouros, os patótipos de DEC podem ser transferidos para carcaças de bovinos durante as etapas de abate e, subsequentemente, para a carne durante o processamento. Etapas como remoção do couro e evisceração são consideradas críticas para essa contaminação. Uma vez na indústria de alimentos, a colonização e a persistência através da formação de biofilme em vários tipos de superfícies podem ser fontes de contaminação por DEC. Além disso, biofilmes microbianos também podem atuar como proteção bacteriana contra condições ambientais adversas. Assim, a execução de forma adequada dos procedimentos durante o abate e o processamento da carne desempenham um papel importante no controle de DEC, onde falhas no processo predispõe a contaminação do ambiente industrial e, conseqüentemente, do produto final (BRICHTA-HARHAY et al., 2008; CARTER et al., 2016; CHAGNOT et al., 2017; GIAOURIS et al., 2015; GOMES et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

O Brasil se destaca na produção e exportação de carne bovina, representando 15% da produção mundial, sendo o maior exportador do mundo. No último levantamento da produção de carne no Brasil, a produção total de carne bovina foi de 10,49 milhões de toneladas, sendo que 23,64% da produção total foram destinados à exportação e 76,36% foram destinados ao mercado interno, resultando em um consumo per capita de 38,37 kg/ano (ABIEC, 2020). Dada a representatividade do Brasil na produção e exportação de carne bovina, e a importância desses animais na manutenção e distribuição de importantes cepas de *E. coli* patogênica, o objetivo deste estudo foi caracterizar a presença de STEC e outros patótipos de DEC em bovinos provenientes dos sistemas de produção extensiva e intensiva e em abatedouros frigoríficos, ao longo da linha de abate e no processamento da carne bovina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

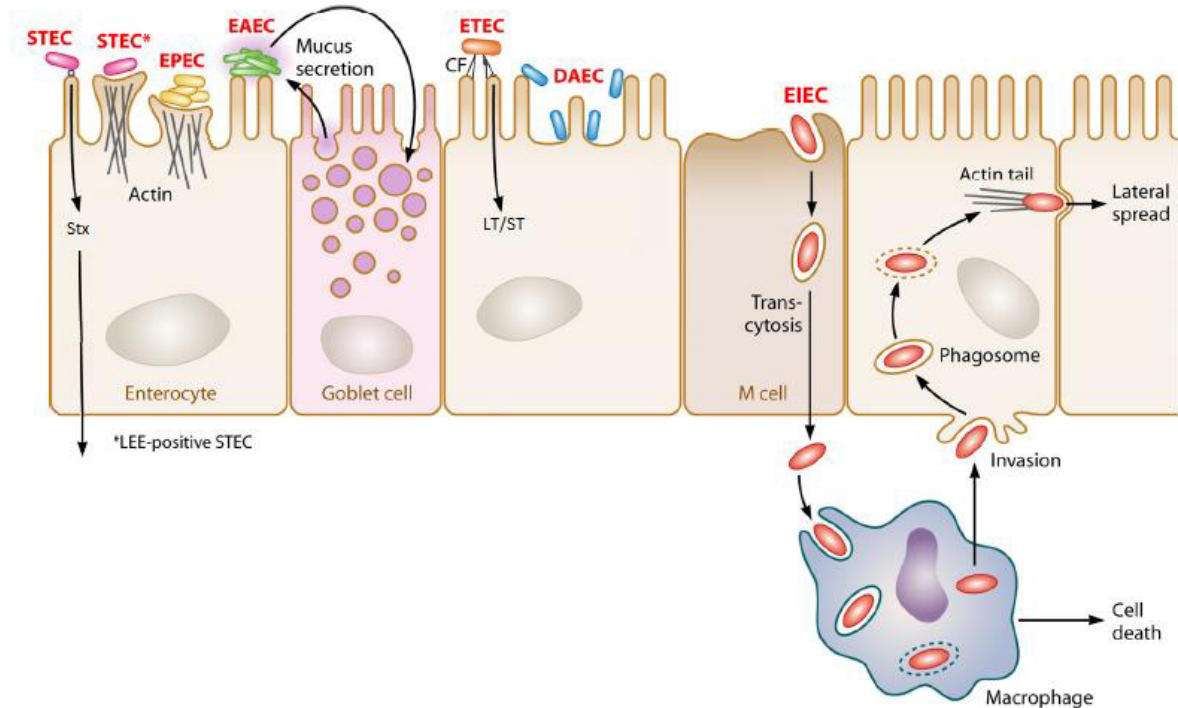
O gênero *Escherichia* consiste em bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e é composto por cinco espécies: *E. albertii*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. A espécie *E. coli* é amplamente distribuída e é o principal microrganismo anaeróbio facultativo que habita o intestino de humanos e animais de sangue quente, onde desempenha um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal. Em 1892, Shardingger propôs o uso de *E. coli* como indicador de contaminação fecal e, posteriormente, como indicador de processamento não higiênico, funções que ainda hoje são amplamente exploradas para a avaliação da qualidade e inocuidade de alimentos e água (FENG et al., 2020; PROCOP et al., 2017).

No entanto, o envolvimento de cepas de *E. coli* em importantes casos e surtos de toxinfecções alimentares, com hospitalizações e óbitos de indivíduos contaminados, demonstra o potencial de algumas cepas em causar doenças tanto em indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos. Muitas dessas cepas representam grande problema de saúde pública, pois apresentam baixa dose infectante e podem ser transmitidas facilmente através de alimentos e água. Linhagens patogênicas de *E. coli* podem causar diferentes enfermidades, caracterizadas pelo acometimento do trato intestinal (grupo de *E. coli* diarreiogênicas, DEC) e também por outros sistemas (grupo de *E. coli* patogênica extraintestinal, ExPEC), como o trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central, o que permite caracterizar esse patógeno como altamente diverso e adaptado (CROXEN et al., 2013; MENG et al., 2013).

O grupo de DEC pode ser classificado basicamente em seis patotipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e STEC (Figura 1). Esses patotipos se diferem quanto aos seus mecanismos de patogenicidade, presença de fatores de virulência, locais preferenciais para colonização, sintomas clínicos e danos nos hospedeiros. Ainda, esses patotipos estão frequentemente associados à alta morbidade e mortalidade entre crianças e a

numerosos surtos de diarreia de origem alimentar no mundo (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; YU et al., 2018).

**Figura 1** – Representação da interação de cada *Escherichia coli* diarreiogênica com a célula-alvo típica



Legenda: Cada um dos seis patótipos reconhecidos de *E. coli* diarreiogênica tem características únicas em sua interação com células eucarióticas: STEC adere aos enterócitos do cólon, onde liberam a toxina Shiga (Stx), cuja absorção sistêmica leva a complicações potencialmente fatais. Ainda, as cepas STEC que possuem a ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), induzem a lesão “*attaching and effacing*” levando a destruição da arquitetura das microvilosidades; EPEC adere aos enterócitos do intestino delgado, com destruição da arquitetura das microvilosidades, induzindo a lesão “*attaching and effacing*”, diferindo de STEC por não produzirem Stx; EAEC adere aos epitélios do intestino delgado e grosso com a formação de biofilme espesso com aderência de bactérias umas às outras, formando um padrão de aderência agregativa conhecido como “tijolo empilhado”; DAEC é dispersa sobre as superfícies dos enterócitos do intestino delgado, resultando em um padrão de aderência difusa; ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado, utilizando fatores de colonização (CF), e induz diarreia aquosa pela secreção de enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou estáveis ao calor (ST); EIEC invade a célula epitelial do cólon, lisa o fagossomo e se move através da célula por nucleação de microfilamentos de actina. A bactéria pode mover-se lateralmente através do epitélio por disseminação direta célula a célula ou pode sair e reentrar na membrana plasmática basolateral. Fonte: adaptado de Croxen et al. (2013) e Kaper, Nataro e Mobley (2004).

O patótipo ETEC é um importante causador de diarreia, especialmente entre crianças. Possui um conjunto diversificado de fatores de colonização para adesão ao epitélio intestinal e é reconhecido por produzir toxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST), que desregulam os canais presentes na membrana epitelial, levando à perda de íons e grandes quantidades de água. A doença é provocada a

partir da colonização e multiplicação nas proximidades do intestino delgado, com produção dessas toxinas, resultando em diarreia aquosa com pouca ou nenhuma febre. Geralmente a transmissão ocorre por alimentos e água contaminada com fezes humanas ou animais (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2020; FLECKENSTEIN et al., 2010; FORSYTHE, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

ETEC apresenta uma elevada capacidade de sobrevivência no ambiente, podendo resistir por até três meses em água fresca e apresenta capacidade de formar biofilmes em fontes de água potável (AHMED et al., 2013; LOTHIGIUS et al., 2010). A dose infectante, comparada com outros padrões de *E. coli*, é relativamente alta e acredita-se que esteja entre  $10^6$  e  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) (CABRERA-SOSA; OCHOA, 2020; CROXEN et al., 2013; LEVINE et al., 1979). Embora ETEC cause uma quantidade significativa de casos, a infecção é autolimitante e raramente é fatal. Na produção animal, ETEC provoca prejuízo econômico uma vez que é um patógeno importante para frangos de corte e bovinos e em suínos é a principal causa de mortalidade em leitões em maternidade e no pós-desmame (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

EIEC normalmente causam disenteria, principalmente devido à capacidade de ligação à mucosa do intestino grosso, seguido de invasão nas células, por endocitose, e destruição do epitélio do cólon. Porém, EIEC pode causar somente diarreia aquosa em alguns casos, não sendo possível diferenciar de outras DEC. A patogenicidade de EIEC está associada à presença de um plasmídeo de virulência necessário para invasão celular (*pInV*), muito semelhante ao encontrado em *Shigella* spp. Apesar dessa semelhança, a doença causada por EIEC é uma forma mais branda e autolimitada (GOMES et al., 2016; JOHNSON; NOLAN, 2009). EIEC são detectadas com menos frequência em animais, uma vez que o principal reservatório desse patótipo é o intestino de humanos infectados. Alguns surtos causados por EIEC foram associados ao consumo de leite e derivados e carne bovina; no entanto, qualquer alimento ou água contaminada com fezes humanas contendo EIEC pode causar a doença. A dose infectante é de  $10^6$  UFC e o tempo de incubação é de 24 horas. Ao contrário de *E. coli* típicas, EIEC são imóveis, não descarboxilam a lisina e fermentam tardiamente a lactose (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2020; FORSYTHE, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MENG et al., 2013).

EAEC é outro patótipo de DEC que está associado à diarreia aguda, e se diferencia por poder causar um quadro de caráter persistente com duração de mais

de 14 dias, principalmente em crianças. Embora a dose infectante de EAEC seja alta para adultos ( $10^{10}$  UFC), a dose para crianças é desconhecida; o período de incubação varia de 8 a 52 horas. A diarreia causada é aquosa, frequentemente com presença de muco, com ou sem sangue, dor abdominal, vômitos e febre baixa (FORSYTHE, 2013; JENSEN et al., 2014; MENG et al., 2013).

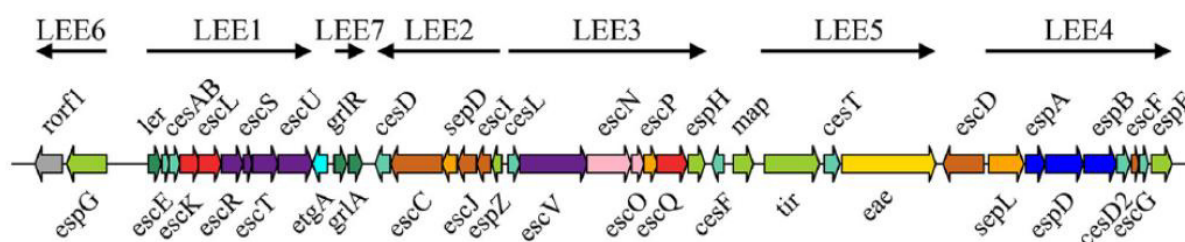
A classificação desse patotipo ocorreu devido às cepas expressarem o padrão de adesão agregativa em culturas celulares (HEp-2). No padrão de adesão agregativa, as bactérias formam agregados em uma configuração que lembra tijolos empilhados, diferenciando-as do padrão de aderência difusa das cepas de DAEC (NATARO et al., 1987; NATARO; KAPER, 1998). Além disso, EAEC possuem capacidade de produção de várias adesinas, toxinas e proteínas que estão envolvidas no processo de virulência, mas a presença dos genes que codificam esses marcadores é bastante variável entre as cepas desse patotipo (GOMES et al., 2016). EAEC pode se ligar ao epitélio do jejuno, íleo e cólon no padrão agregativo característico, formando um forte biofilme em uma camada de muco, seguido por efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010, 2011). Esse patotipo é transmitido pela via fecal-oral por alimentos ou água contaminada. Não há evidências de relação entre cepas de EAEC isoladas de humanos e diferentes espécies animais, o que sugere que os animais podem não representar o principal reservatório de EAEC típico patogênico humano (CROXEN et al., 2013; UBER et al., 2006).

Assim como EAEC, cepas de DAEC foram caracterizadas pelo padrão de adesão em culturas de células HeLa ou HEp-2 expressando, por sua vez, o padrão aderência difusa (NATARO et al., 1987; NATARO; KAPER, 1998). As cepas de DAEC basicamente se dividem em cepas produtoras de adesinas Afa/Dr (Afa/Dr DAEC), incluindo pelo menos quatorze adesinas fimbriais e não fimbriais, e cepas que não as produzem. As cepas Afa/Dr DAEC estão associadas às infecções do trato urinário e à diarreia em crianças de 18 meses a 5 anos, mas também podem estar presentes na microbiota intestinal de crianças e adultos assintomáticos. O gene da proteína autotransportadora (*secreted autotransporter toxin - Sat*) também parece correlacionar-se com as cepas Afa/Dr DAEC, além da detecção de maior indução de secreção de interleucina 8 pelas Afa/Dr DAEC, atuando positivamente no desenvolvimento do quadro diarreico (GUIGNOT et al., 2007; SERVIN, 2014; TANIMOTO et al., 2019).

Alguns estudos demonstram o isolamento de DAEC em fezes diarreicas de crianças, apesar de ocorrer o isolamento desse mesmo patógeno em indivíduos de mesma idade saudáveis em taxas semelhantes aos pacientes doentes. Desse modo, a diarreia induzida por DAEC permanece controversa, onde o seu envolvimento como agente causador do quadro não está claro, assim como o modo de transmissão e reservatórios são desconhecidos (CROXEN et al., 2013; KNUTTON et al., 2001; LOPES et al., 2005).

Cepas do patotipo EPEC, por sua vez, possuem genes cromossômicos agrupados na ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), responsáveis por provocar lesões nos enterócitos denominada *attaching and effacing* (NATARO; KAPER, 1998; STEVENS; FRANKEL, 2014). A patogenicidade dessas bactérias depende de um sistema de secreção do tipo III (T3SS), que auxilia na translocação de proteínas efetoras do citosol bacteriano para as células infectadas. A região LEE é composta por 41 genes, divididos em sete *operons* (Figura 2): os *operons* LEE1, LEE2 e LEE3 codificam os componentes do T3SS e o regulador Ler (*LEE-encoded regulator*), que controla a expressão dos demais *operons*; LEE4 codifica as proteínas efetoras (EspA, EspB, EspD e EspF); LEE5 codifica a proteína de membrana externa denominada intimina, que desempenha um importante papel na adesão à célula epitelial, e seu receptor Tir; LEE6 contém os genes *espG* e *orf1*; LEE7 codifica os reguladores GrIA (*global regulator of LEE-activator*) e GrIR (*global regulator of LEE-regulator*) (DENG et al., 2004; ELLIOTT et al., 1998, 2000; GAYTÁN; MARTÍNEZ-SANTOS; SOTO, 2016; YERUSHALMI et al., 2014).

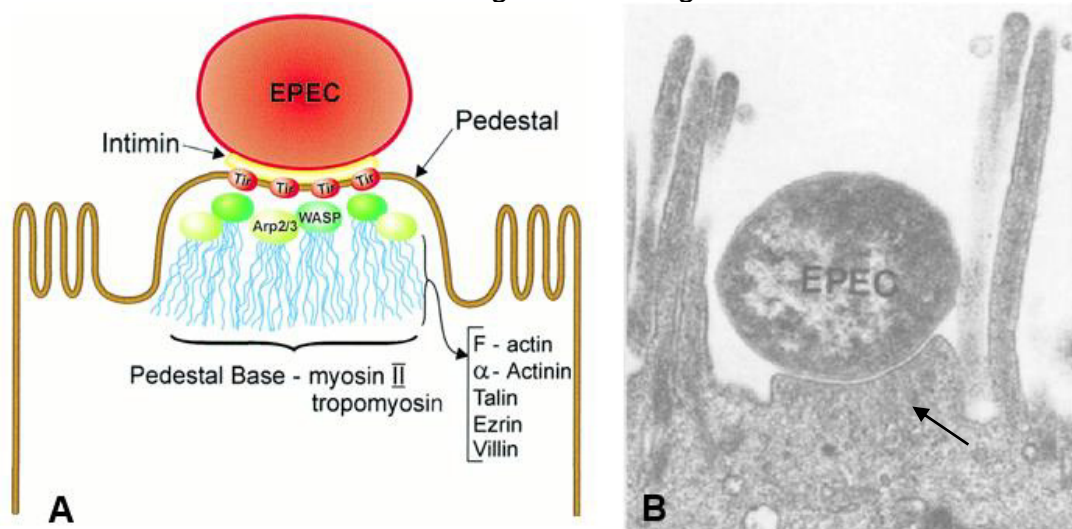
**Figura 2** – Estrutura genética da ilha de patogenicidade *Locus of Enterocyte Effacement*



Fonte: Gaytán, Martínez-Santos e Soto (2016).

Durante a lesão *attaching and effacing* (Figura 3), observa-se uma destruição das microvilosidades intestinais e a aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, com a formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, cuja base é rica em actina e outros elementos do citoesqueleto. A reorganização do citoesqueleto altera a morfologia e fisiologia normal da região apical das células, o que leva a perda das microvilosidades e suas funções, resultando em diarreia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A infecção decorrente de EPEC ocorre principalmente em crianças menores de dois anos de idade, em países em desenvolvimento, sendo a diarreia aguda seu principal sintoma clínico (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2020; FORSYTHE, 2013; NATARO; KAPER, 1998).

**Figura 3** – Formação do pedestal e destruição da arquitetura das microvilosidades intestinais decorrente da lesão *Attaching and Effacing*



Legenda: A) Esquematização da estrutura do pedestal. B) Micrografia eletrônica da mucosa intestinal humana infectada com EPEC cepa E2348 durante a formação da lesão *attaching and effacing* (seta). Após a fixação inicial, as bactérias induzem a supressão das microvilosidades por um processo de desestruturação do citoesqueleto e vesiculação da membrana. As bactérias então se fixam intimamente, através da ligação intimina-Tir, à membrana do enterócito apical desprovida de microvilosidades. Proteínas de ligação à actina (WASP e Arp2/3) são recrutadas nucleando a actina. F-actina, α-actinina, talina, ezrina e vilina são encontradas ao longo do pedestal, enquanto a miosina II não muscular e a tropomiosina são encontradas na base do pedestal. Fonte: Knutton (1995) e Vallance e Finlay (2000).

O patotipo EPEC é subdividido em dois grupos, sendo EPEC típica (tEPEC) as cepas que apresentam o plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*), onde se localizam os genes envolvidos na montagem e expressão de uma adesina fimbrial (*bundle-forming pilus*, BFP). Essa fímbria permite a aderência interbacteriana e possibilita a adesão às células epiteliais. Já as cepas de EPEC que não possuem

esse plasmídeo fazem parte do grupo EPEC atípica (aEPEC) (HERNANDES et al., 2009; NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIDAL; CANIZÁLEZ-ROMÁN, 2007).

As cepas tEPEC e aEPEC também têm diferentes padrões de aderência em cultivos celulares. Devido à expressão da fímbria BFP, tEPEC apresentam um padrão característico de adesão denominado de *localized adherence* (LA), na qual as bactérias se aderem em grupos compactos, em um ou mais pontos na superfície da célula epitelial, após um período de infecção de 3 horas. Já aEPEC podem expressar o padrão denominado de *localized adherence like* (LAL), onde as bactérias aderem em grupos bastante espaçados, em um ou mais pontos da superfície da célula hospedeira, que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados (6 horas). Além do padrão LAL, os padrões de adesão difusa e adesão agregativa também são observados em algumas cepas de aEPEC (HERNANDES et al., 2006, 2009; RODRIGUES et al., 1996; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A doença diarreica causada pelo patotipo tEPEC diminui com a idade e infecções em adultos raramente são relatadas. Essa aparente resistência em adultos e crianças mais velhas tem sido atribuída à perda de receptores específicos com a idade e o desenvolvimento de imunidade. A dose infectante que causa a doença em crianças é desconhecida. Já o patotipo aEPEC pode ser encontrado em pacientes diarreicos de todas as idades. Os surtos causados por EPEC tem mostrado uma distribuição sazonal com picos observados durante os meses quentes (DIAS et al., 2016; GOMES et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998). Ao contrário de tEPEC, que raramente é encontrado em animais, cepas de aEPEC foram encontradas em animais diarreicos e saudáveis. Os sorogrupos O26, O103, O119, O128, O142 e O157 de aEPEC isolados de animais já foram identificados em quadros de diarreia humana, sugerindo assim o potencial zoonótico de algumas cepas (HERNANDES et al., 2009; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; MOURA et al., 2009).

Entre os patotipos de DEC, STEC é o patotipo que possui um importante potencial zoonótico, principalmente associado a alimentos de origem animal. A via de transmissão de STEC é fecal-oral e a dose infectante é considerada muito baixa (apenas 10-100 UFC são suficientes para a infecção). STEC é um importante enteropatógeno cujos sintomas variam de uma simples diarreia até quadros de diarreia sanguinolenta, e podem evoluir para SHU e púrpura trombocitopênica



trombótica, que pode levar à falência renal e óbito (CLEMETS et al., 2012; GOMES et al., 2016; HUNT, 2010). A maioria dos casos de doenças diarreicas no mundo causado por STEC está associada ao sorotipo O157:H7, mas sorogrupos como O26, O45, O103, O111, O121 e O145 também têm sido reportados em infecções do trato intestinal em humanos (FORSYTHE, 2013; GOULD et al., 2013; PERELLE et al., 2007).

O principal fator de virulência desse patotipo é a toxina Shiga (Stx), codificada por bacteriófagos específicos (GOMES et al., 2016). Stx são citotoxinas de origem proteica divididas em Stx1 (Stx1a, Stx1c e Stx1d) e Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g), de acordo com seus efeitos citotóxicos em células Vero ou HeLa, atividade biológica, imunorreatividade e análise filogenética das sequências dos genes *stx* (MELTON-CELSA, 2014; PATON; PATON, 1998; SCHEUTZ et al., 2012). Stx são produzidas no colón e transportadas pela corrente sanguínea até os rins, onde causam danos nas células endoteliais renais e obstruem a microvasculatura local, através da combinação da toxicidade direta da toxina e indução local da produção de quimiocinas, resultando assim, na inflamação renal que pode levar ao desenvolvimento da SHU (NGUYEN; SPERANDIO, 2012; POLITO; MASTROIANNI, 2010). A Stx2 tem demonstrado maior patogenicidade devido à sua forte associação com o desenvolvimento da SHU, síndrome caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal (MELTON-CELSA, 2014; SCHEUTZ et al., 2012).

Além da produção da Stx, algumas cepas de STEC também possuem a ilha de patogenicidade LEE, cujo genes são altamente conservados entre os microrganismos que possuem capacidade de causar lesões *attaching and effacing*, como EPEC e *Citrobacter rodentium*. Essas cepas fazem parte de uma subcategoria do patotipo STEC, STEC *eae+*, amplamente conhecido como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (CROXEN; FINLAY, 2010; GAYTÁN; MARTÍNEZ-SANTOS; SOTO, 2016; NATARO; KAPER, 1998; NGUYEN; SPERANDIO, 2012; STEVENS; FRANKEL, 2014). Todos os genes codificados na ilha de patogenicidade LEE de EPEC estão presentes em LEE de STEC *eae+* na mesma ordem, e possuem um alto grau de conservação apresentando uma identidade média de 94% ao nível de nucleotídeos (PERNA et al., 1998). Devido à essa capacidade de aderir a membrana da célula e colonizar o intestino grosso, essa subcategoria tem sido fortemente associada à diarreia sanguinolenta, dores abdominais, anemia hemolítica

e à SHU em países industrializados, e frequentemente são relacionadas a doenças humanas severas (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A expressão de outros genes da região LEE resulta na liberação de outros fatores de virulência importantes associados à patogenia das cepas STEC *eae+* como adesina, intimina (*eae*), proteínas do sistema de secreção tipo III (Esc e Esp), chaperoninas (proteínas Ces), proteínas efetoras (EspF, EspG, Map) e um receptor para intimina (*translocated intimin receptor - Tir*) (GIRARD et al., 2005). O gene que codifica a enterohemolisina (*Ehly*) observada nessas cepas pertencem ao plasmídeo pO157. O mesmo plasmídeo ainda possui genes que codificam uma catalase-peroxidase (KatP) e uma serina protease (ESpP) relacionada com a exacerbação da doença hemorrágica (BEUTIN et al., 1993; BRUNDER; SCHMIDT; KARCH, 1996).

## 2.2. OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE BOVINA

O Brasil se destaca na produção e exportação de alimentos de origem animal, incluindo a carne bovina, suína, de aves. Na pecuária de corte, o país representa 15% da produção mundial de carne bovina, sendo o maior exportador do mundo. Com um rebanho de 213,68 milhões de bovinos, em 2019, foram abatidos 43,3 milhões de animais no país. As exportações brasileiras de carne bovina encerraram 2019 com uma receita de US\$ 7,6 bilhões e um crescimento de 12,2% em relação a 2018. Além do destaque que o país tem no mercado internacional de carne bovina, a pecuária de corte foi responsável pela movimentação interna de R\$ 618,50 bilhões em 2019. Reflexo da utilização de insumos na produção do gado, passando pelo faturamento da venda dos animais, até o total comercializado pelas indústrias e varejo (ABIEC, 2020). Devido à influência da produção de carne bovina no Brasil, é importante que diversos segmentos da indústria de carne se comprometam com a melhoria da qualidade de seus produtos para obter melhor retorno econômico e garantir um menor risco aos consumidores.

Entre os riscos que podem comprometer o setor produtivo da carne bovina podemos citar a contaminação por patógenos do grupo DEC, devido ao seu envolvimento em casos de infecções já relatados em todo o mundo. Dentre os patótipos de DEC, STEC está naturalmente presente nos animais de produção, sendo os bovinos o principal reservatório desses microrganismos, encontrados em

alta prevalência entre animais saudáveis (CHASE-TOPPING et al., 2008; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; NGUYEN; SPERANDIO, 2012; SCOTT et al., 2006). Enquanto as espécies como suínos e seres humanos são clinicamente acometidos por STEC (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010; TSENG et al., 2014), os bovinos adultos são geralmente assintomáticos, principalmente devido à ausência de receptores como o glicolípido globotriaosilceramida - Gb3 usado para a ligação das Stx, o que permite um relacionamento comensal entre STEC e bovinos (CALLAWAY et al., 2013a; MATHUSA et al., 2010; MUNNS et al., 2015).

Nas propriedades de gado de corte, o principal modo de transmissão de DEC, sobretudo STEC, entre os animais é através do contato entre os bovinos, contato com fezes, alimentos e água contaminados e por meio de moscas, que são um importante vetor de *E. coli*, principalmente as pertencentes às famílias *Muscidae* e *Calliphoridae*, facilitando a transmissão por toda cadeia: gado, vegetação e possivelmente aos humanos (AHMAD; NAGARAJA; ZUREK, 2007; BERRY; WELLS, 2010; SAPOUNTZIS et al., 2020). Outro fator que contribui para disseminação entre os bovinos é a capacidade de sobrevivência de STEC no ambiente de produção animal, podendo sobreviver por várias semanas na água, solo ou esterco de gado, além da necessidade de uma baixa carga bacteriana para colonizar um novo hospedeiro (CHAUCHEYRAS-DURAND; DUNIÈRE; FORANO, 2016; FREMAUX; PRIGENT-COMBARET; VERNZOZY-ROZAND, 2008).

A presença de STEC é constantemente confirmada em bovinos em pesquisas em todo o mundo com frequências variadas. No continente europeu, Kagambèga et al. (2012) obtiveram um total de 37,0% amostras de fezes de bovinos positivas para STEC (Finlândia). Em Portugal, Ballem et al. (2020) descreveram STEC numa prevalência de 27,4% em bovinos leiteiros e, na Espanha, as taxas gerais de prevalência de colonização por STEC encontradas por Blanco et al. (2004) foram estimadas em 37,0% para bezerros e 27,0% para vacas de leite. Na França, 96 isolados foram obtidos em um estudo a partir de amostras fecais de bovinos leiteiros e de corte (n = 1318), sendo 33 isolados confirmados como STEC (BIBBAL et al., 2015).

Na Ásia, Osaili, Alaboudi e Rahahlah (2013), ao fazerem um levantamento de STEC em bovinos abatidos na Jordânia, obtiveram 12,2% dos bovinos portadores do patógeno, percentual semelhante ao encontrado por Tahamtan, Hayati e

Namavari (2010), que observaram 12,14% (51/420) dos bovinos amostrados positivos para STEC no Irã (10,3% dos isolados foram classificadas como *E. coli* O157:H7 e 89,7% não-O157). No continente africano, El-Seedy et al. (2016) detectaram uma prevalência de 75,6% de DEC em fezes diarreicas de bezerros (Egito). *Escherichia coli* O157 foi detectada em 7,1% das 240 amostras de conteúdo retal de bovinos na Etiópia (GUTEMA et al., 2021) e 6,2% das 97 amostras de fezes de bovinos na Líbia (AHMED; ABOUZEED, 2014). Bako et al. (2017) caracterizaram DEC em 340 amostras de fezes bovinas e evidenciaram STEC em 0,58% (Burkina Faso). Na Oceania, na pesquisa desenvolvida por Barlow e Mellor (2010), foi encontrada uma frequência de 1,67% *E. coli* O157 em fezes bovinas (Austrália).

Nas Américas, um estudo realizado em Michigan (EUA), em 2012, mostrou taxas de prevalência de STEC de 21,0% para gado de corte e 13,0% para gado leiteiro (VENEGAS-VARGAS et al., 2016). Em um estudo desenvolvido no Canadá, 45,0% (54/119) das fazendas amostradas tiveram pelo menos um animal portador de *E. coli* O157:H7, sendo que a frequência nas amostras fecais bovinas analisadas foi de 6,0% (459/7519) (CERNICCHIARO et al., 2009). No México, Rivas-Ruiz et al. (2020) obtiveram uma incidência de STEC O157:H7 de 3,1% e STEC não-O157 de 19,8% em gado de corte assintomático. Em um outro estudo realizado no México, com vacas leiteiras, 393 isolados foram obtidos a partir de 252 amostras pertencentes a cinco patótipos de DEC: 105 (26,7%) pertenciam ao grupo ETEC, 68 (17,3%) ao grupo EPEC, 45 (11,5%) ao grupo EIEC, 15 (3,8%) ao grupo EAEC e 160 (40,7%) ao grupo STEC (NAVARRO et al., 2018). Na Argentina, Tanaro et al. (2012) obtiveram um isolamento de STEC em 36,6% dos bovinos, enquanto Masana et al. (2011) relataram uma prevalência de 22,3% e Pizarro et al. (2013) uma prevalência de 12% em fezes de bovinos. No Peru, Rivera et al. (2012) encontraram 16% de bovinos colonizados por STEC.

No Brasil, o primeiro relato de isolamento de *E. coli* O157:H7 em gado bovino ocorreu, em 1999, por Cerqueira et al. (1999) que, ao analisarem amostras de fezes de 197 bovinos de corte e leiteiro no Rio de Janeiro, detectaram STEC em 139 (71,0%) animais, sendo 82,0% (99/121) em gado leiteiro e 53,0% (40/76) em gado de corte. O sorotipo O157:H7 foi isolado em 1,5% dos animais. Ao longo dos anos, outros estudos foram desenvolvidos no Brasil detectando frequências em bovinos que variaram de 5 a 72,73% de STEC (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; ANDRADE et al., 2012; CARVALHO et al., 2012; FARAH et al., 2007; FERREIRA et

al., 2014, 2018; IRINO et al., 2005; JÚNIOR et al., 2017; LEOMIL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; PIGATTO et al., 2008; TIMM et al., 2007; TRISTÃO et al., 2007).

Além de detectar a presença de *E. coli* patogênica sem a indução do quadro clínico nos bovinos, é comum a presença de animais *super-shedding* na espécie bovina. O termo *super-shedding* caracteriza indivíduos que por um determinado período excretam uma alta quantidade do patógeno quando comparado a outros indivíduos da mesma espécie, eliminando cerca de até  $10^4$  UFC/g nas fezes. A principal causa para ocorrência desse quadro parece estar relacionado com a formação de biofilmes na porção final do reto, o que pode levar à eliminação de um grande número de células do microrganismo. Esses animais têm grande importância na transmissão de STEC dentro do rebanho e entre as fazendas, o que aumenta o contato direto e a exposição ambiental e de seres humanos (CASTRO et al., 2017; CHASE-TOPPING et al., 2008; MUNNS et al., 2015).

Por sua vez, os bovinos são implicados na disseminação de DEC ao longo da cadeia de obtenção da carne bovina, mantendo esses patógenos na produção animal e podendo carregá-los até os abatedouros frigoríficos. Uma vez no ambiente industrial, esses patógenos podem ser transferidos para carcaças de bovinos durante as etapas de abate e, subsequentemente, para a carne durante o processamento. Assim, estudos envolvendo o levantamento da frequência de DEC em alimentos têm como principais alvos de pesquisa as carcaças bovinas, carne moída, cortes cárneos e hambúrgueres em muitos países. EAEC, EIEC, ETEC e EPEC já foram isolados nesses alimentos (ABRI et al., 2019; AMÉZQUITA-MONTES et al., 2015; CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013; FALLAH et al., 2021; MOHAMMED, 2012; PELAYO et al., 2019; TAHA; YASSIN, 2019), no entanto, STEC tem sido relatado como o patótipo mais frequentes.

O isolamento de STEC em carcaças bovinas pode ser observado em diversos estudos. Pesquisas realizadas em São Paulo em diferentes períodos, detectaram frequências que variaram entre 1,2% a 27,0% das carcaças bovinas amostradas (CARVALHO et al., 2012; RIGOBELLO et al., 2006; RIGOBELLO; ÁVILA, 2012; RIGOBELLO; SANTO; MARIN, 2008). No Mato Grosso, as frequências obtidas de STEC foram de 4,7% e 27,8% (CASTRO et al., 2019b; SANTOS et al., 2018) e no Rio Grande do Sul foi de 20,37% (LOIKO et al., 2016). Outras frequências de STEC já foram observadas em carcaças, como 5,4% no Canadá (BOHAYCHUK;

GENSLER; ROMERO BARRIOS, 2011); 23,0% no Iraque (TAHA; YASSIN, 2019); 3,0% na Polônia (WIECZOREK; BEUTIN; OSEK, 2011); 27,0% no Reino Unido (MONAGHAN et al., 2012); 3,9% a 60,6% nos Estados Unidos (ARTHUR et al., 2002; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2003; COBBOLD et al., 2008; ELDER et al., 2000; STROMBERG et al., 2015; SVOBODA et al., 2013).

Em amostras de carne bovina e derivados, Fallah et al. (2021) avaliaram os perfis de ocorrência dos patótipos de DEC em produtos obtidos de mercados públicos em Mashhad, no Irã. Os pesquisadores encontraram uma taxa de 26,7% das amostras contaminadas com grupos patogênicos de DEC. O alimento mais contaminado foi a carne moída (11/34; 32,35%), seguido do hambúrguer (14/45; 31,11%) e da carne vermelha (15/71; 21,13%). Nesse estudo, STEC foi o patótipo mais comum (67,5%). Assim como esses pesquisadores, a contaminação de produtos cárneos de origem bovina por DEC, sobretudo STEC, vem sendo estudada em várias partes do mundo e pode ser evidenciada na Tabela 1.

O percentual de isolamento de DEC ao longo de toda cadeia de produção de carne bovina deve ser analisado com cautela já que podem ser observadas oscilações nas frequências em detrimento do planejamento metodológico para identificação do microrganismo, como estratégia de amostragem, tipo e quantidade de amostras, procedimentos de enriquecimento, utilização ou não de separação imunomagnética, triagem por metodologias moleculares, meios de cultura de isolamento de escolha, além dos fatores intrínsecos ao sistema de criação e espécie animal estudada (ISLAM et al., 2014).

**Tabela 1** – Taxa de contaminação por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em carne bovina e produtos cárneos de origem bovina em diferentes países

País	Produto	Metodologia	Amostra % (+/N)*	Referência	
Argentina	Carne Moída	Isolamento	5,32 (9/169)	Jure et al. (2015)	
			77,78 (70/90)	Brusa et al. (2013)	
Austrália	Carne Moída	stx-PCR	26,0 (74/285)	Barlow, Gobius e Desmarchelier (2006)	
		Isolamento	16,0 (45/285)		
Bangladesh	Corte cárneo	stx-PCR	68,3(41/50)	Islam et al. (2010)	
		Isolamento	8,3 (5/60)	Islam et al. (2010)	
Brasil	Carne Moída	Isolamento	0,0 (0/138)	Ristori et al. (2017)	
		Isolamento	1,6 (4/250)	Bergamini et al. (2007)	
		Isolamento	2,1 (2/91)	Rodolpho e Marin (2007)	
	Corte cárneo	Isolamento	11,11 (2/18)	Santos et al. (2018)	
		PCR	0,3 (1/326)	Prata et al. (2013)	
		Isolamento	4,67 (5/107)	Castro et al. (2019b)	
	Hambúrguer	Isolamento	1,6 (4/250)	Bergamini et al. (2007)	
		Isolamento	1,45 (2/138)	Ristori et al. (2017)	
		Isolamento	2,86 (2/70)	Peresi et al. (2016)	
Canadá	Corte cárneo	Isolamento	0,7 (1/150)	Jones et al. (2014)	
Chile	Carne moída	stx-PCR	49,3 (212/430)	Toro et al. (2018)	
		Isolamento	10,0 (43/430)	Toro et al. (2018)	
China	Corte cárneo	stx-PCR	33,0 (63/191)	Bai et al. (2015)	
		Isolamento	9,9 (19/191)	Bai et al. (2015)	
		stx-PCR	60,9 (53/87)	Li et al. (2016)	
Egito	Carne moída	Isolamento	11,1 (3/27)	Ahmed e Abouzeed (2014)	
	Corte cárneo	Isolamento	16,7 (5/30)	Ahmed e Abouzeed (2014)	
	Hambúrguer	Isolamento	33,3 (10/30)	Ahmed e Abouzeed (2014)	
Espanha EUA	Carne Moída	Isolamento	12,0 (95/785)	Mora et al. (2007)	
		stx-PCR	24,3 (1006/4133)	Bosilevac e Koohmaraie (2011)	
		Isolamento	7,3 (300/4133)	Bosilevac e Koohmaraie (2011)	
	Corte cárneo	stx-PCR	8,5 (21/249)	Ju et al. (2012)	
		Isolamento	5,2 (13/249)	Ju et al. (2012)	
		stx-PCR	29,5 (91/308)	Wasilenko et al. (2014)	
	Itália	Produtos cárneos	stx-PCR	36,0 (173/480)	Cobbold et al. (2008)
			Isolamento	9,1 (44/480)	Cobbold et al. (2008)
			stx-PCR	8,4 (21/250)	Nobili et al. (2017)
Iraque	Carne Moída	Isolamento	2,0 (5/250)	Nobili et al. (2017)	
		stx-PCR	8,4 (20/239)	Varcasia et al. (2018)	
		Isolamento	0,0 (0/120)	Taha e Yassin (2019)	
Turquia	Carne Moída	Isolamento	28,5 (2/120)	Taha e Yassin (2019)	
		stx-PCR	12,5 (14/116)	Aslan et al. (2018)	
Uruguai	Corte cárneo	stx-PCR	28,0 (72/256)	Bosilevac et al. (2007)	
		Isolamento	15,6 (40/256)	Bosilevac et al. (2007)	

Legenda:\*(+/N): amostras positivas/número de amostras analisadas. Fonte: Adaptado de Assis et al. (2021) e Brusa et al. (2020).

### 2.3. CONTROLE DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

Os seres humanos podem se contaminar por qualquer patótipo de *E. coli* através de diversas formas, sendo que a principal via de transmissão é a via fecal-oral. Na maioria dos casos, a transmissão do patógeno está relacionada ao consumo de alimentos e água contaminada com fezes, cuja contaminação pode ocorrer de forma direta ou indireta. O consumo de carne bovina crua ou mal cozida, leite não pasteurizado e águas de abastecimento, água usada na irrigação de outros alimentos, como vegetais frescos, e água de recreação contaminados pelo conteúdo intestinal de animais, sobretudo dos bovinos, são as principais formas de se adquirir essas bactérias (GYLES, 2007; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; PATON; PATON, 1998; SARGEANT et al., 2004).

O papel da produção animal na contaminação por alguns patótipos de DEC já está bem estabelecido devido à sua presença natural no trato intestinal dos animais e à possível transferência desses patógenos para as carcaças durante o abate e conseqüente contaminação de produtos finais. As principais etapas críticas para a contaminação por DEC ocorre durante a remoção do couro e na evisceração. Procedimentos adequados durante o abate e o processamento da carne desempenham um papel importante em seu controle, e quando ocorre uma falha na operação pode ocorrer a contaminação do ambiente industrial e da carne (BRICHTA-HARHAY et al., 2008; CHAGNOT et al., 2017; SANTOS et al., 2017).

O controle ideal dos patótipos de DEC, que possuem os bovinos como reservatório, precisa envolver todas as etapas da produção de alimentos em um conceito conhecido como *from farm to fork*. A maneira como o gado é criado pode modular a microbiota predominante e atuar como um fator para a seleção e disseminação desses patógenos. Uma vez nas instalações de abate e processamento, os microrganismos podem se disseminar e contaminar os produtos finais. Então, esses produtos atuarão potencialmente como veículos de transmissão para esses patógenos:



### 2.3.1. Produção primária

A pecuária de corte se divide basicamente em dois sistemas de criação: a pasto (predominantemente sistema extensivo de produção) e confinado (sistema intensivo de produção). Cada sistema possui diferentes características e graus de tecnificação e podem ser associados para obtenção de melhores resultados de produtividade. Na pecuária extensiva, a criação de animais ocorre em grandes áreas, não demanda grandes investimentos e é o tipo de criação mais usado no Brasil, sendo que 85,94% dos animais abatidos no país são “terminados” a pasto. A pecuária intensiva se baseia na criação do gado em confinamento, sendo mais comum o uso de tecnologias mais avançadas como a manipulação genética e a inseminação artificial. Tem como objetivo aumentar a produtividade e corresponde a 14,96% dos animais abatidos no país (ABIEC, 2020; CEZAR et al., 2005; MCALLISTER et al., 2020; OLIVEIRA; MILLEN, 2014; WALL et al., 2016).

A principal característica do sistema extensivo de produção, além da maior área onde os animais são criados, é a alimentação que se baseia em pastagens nativas ou cultivadas como única fonte de alimentos energéticos e proteicos, sendo comum a prática de suplementação com o fornecimento de sal comum e sal mineral. Em períodos de seca, comum em regiões como sudeste e centro-oeste, costuma-se complementar a suplementação com a utilização de ureia na mistura mineral ou mesmo com compostos proteicos de baixo custo. O manejo nutricional pode ser considerado como um dos principais fatores que afetam a produção e a lucratividade de bovinos de corte (CPT, 2020; POPPI et al., 2018).

Quando comparado aos bovinos em sistema extensivo de criação, a terminação de bovinos em confinamento traz uma série de vantagens para a cadeia produtiva da pecuária de corte, contribuindo para um maior equilíbrio na oferta de animais terminados ao longo do ano, redução na pressão sobre as pastagens durante o período de seca e diminuição na idade de abate, onde o animal sai do confinamento entre 24 e 36 meses. Outro ganho no sistema intensivo de criação do gado é a redução da área utilizada. O número de animais por confinamento é bastante variável dependendo do tipo de empreendimento, podendo ocorrer com números que ultrapassam a faixa de 100 a 3.000 animais (CEZAR et al., 2005; CPT, 2020; MACITELLI; BRAGA; COSTA, 2020).

As dietas de confinamento são fornecidas direto no cocho e contêm grandes quantidades de alimentos concentrados (> 70%). Essas dietas são projetadas para aumentar a gordura subcutânea e intramuscular (marmoreio), sendo compostas por cevada, trigo, milho e sorgo, e são administradas como ração e/ou como silagem. A maioria dos aditivos incorporados nas dietas de bovinos de corte confinados tem como finalidade modular a fermentação ruminal, melhorar a eficiência alimentar e evitar a acidose ruminal, abscessos hepáticos e pododermatite (MCALLISTER et al., 2020; TAYLOR et al., 2010). Alguns estudos associam a dieta a base de grãos com a presença de animais *super-shedding* e a altas frequências de isolamento de *E. coli* patogênicas (BERARD et al., 2009; CUEVA et al., 2010). Ainda, a sobrevivência de STEC, especialmente de STEC O157, tem se mostrado maior nas fezes de bovinos alimentados com grãos (LOWE et al., 2010).

Sistemas modernos de produção propiciam melhor controle de doenças, devido à facilidade de detecção do animal doente possibilitando a segregação e o tratamento. Ao mesmo tempo, esse sistema favorece o surgimento de problemas sanitários devido à intensificação da produção (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004; CATRY et al., 2016; DAVIES, 2017). A alta densidade da população animal em confinamento concentra o acúmulo de dejetos e a presença de microrganismos no ambiente, o que proporciona condições para o surgimento de patologias que não são comuns nos sistemas convencionais de produção extensiva, além de facilitar a troca de material genético entre os microrganismos e facilitar a disseminação entre animais (CEZAR et al., 2005; CPT, 2020; DAVIES, 2017; GOMES et al., 2016; JARDIM et al., 2006).

Ainda, a microbiota intestinal dos animais criados em sistema intensivo, devido à proximidade e concentração animal, tende a ter uma diversidade reduzida, o que pode resultar em um crescimento significativo de uma população bacteriana em detrimento de outras populações bacterianas. Uma vez que DEC pode ser facilmente encontrada na microbiota de animais de produção, esse grupo pode ter sua população em destaque e ser amplamente distribuída entre os animais de um mesmo confinamento. Assim, um sistema intensivo executado com baixa biossegurança e manejo precário pode apresentar uma alta probabilidade de carrear cepas de importância em saúde pública (SCHOKKER et al., 2014; WALL et al., 2016; ZHU et al., 2013).

A dieta, a temperatura e a estação do ano, as práticas de manejo dos animais, a distância de fontes de água contaminadas, o contato com animais selvagens, o uso de dejetos na adubação de pastagens e a densidade da população animal constituem alguns dos fatores que, comprovadamente, exercem um importante efeito na prevalência de STEC, podendo contribuir para o aumento ou a diminuição da população do patógeno nos bovinos e na composição da microbiota intestinal nativa (SAPOUNTZIS et al., 2020; SPENCER et al., 2015). Embora o gado confinado compartilhe fontes comuns potenciais de exposição para *E. coli*, bovinos em pastagens estão mais suscetíveis ao contato com efluentes de esgoto, alimentos e água contaminados, ao uso de fontes de água compartilhadas com outras espécies animais como ovinos, suínos, cães e pássaros, às falhas de biossegurança estando mais suscetível à contaminação proveniente de animais selvagens (CALLAWAY et al., 2013a; JARDIM et al., 2006; RENTER; SARGEANT; HUNGERFORD, 2004).

A comunidade microbiana do trato gastrointestinal é crítica para a saúde e o bem-estar do hospedeiro e mesmo pequenas mudanças nessas populações podem afetar a produtividade do gado (CALLAWAY et al., 2009). A microbiota normal não apenas produz os nutrientes necessários (vitaminas e ácidos graxos voláteis de cadeia curta) (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004; FLINT et al., 2007), mas também tem sido implicada no desenvolvimento de um sistema imunológico saudável e na exclusão de patógenos entéricos (BUFFIE; PAMER, 2013; KAMADA; CHEN; NÚÑEZ, 2013).

Essa modulação na microbiota decorrente das práticas de manejo e mudança alimentar do rebanho bovino pode repercutir na taxa de sobrevivência e multiplicação de STEC. Xu et al. (2014) sugeriram que as mudanças na composição da comunidade microbiana em bovinos podem resultar na degradação diferencial da matéria orgânica, levando a um ambiente nutricional mais favorável para a proliferação de *E. coli* O157:H7. Para que esse microrganismo persista no trato intestinal é necessário superar a competição microbiana e/ou possuir mecanismos capazes de explorar a microbiota (SAPOUNTZIS et al., 2020). Já foi evidenciado que STEC possui um sistema de resistência a ácido que é ativado através da microbiota ruminal, fazendo com que esse patógeno consiga sobreviver ao pH do abomaso (SPERANDIO, 2010). Ainda, cepas de STEC são mais propensas a usar dulcitol e sacarose como fontes de carbono atribuindo uma vantagem com relação a

outras *E. coli* comensais, e também tendem a utilizar compostos como serina, glicerol e lactato que são menos utilizados no metabolismo da microbiota nativa dos bovinos (BERTIN et al., 2014; DURSO; SMITH; HUTKINS, 2004). Além disso, STEC pode utilizar etanolamina livre no intestino delgado de bovinos como fonte de nitrogênio que, provavelmente, fornece uma vantagem nutricional para STEC uma vez que não constitui um substrato de predileção para a microbiota intestinal (BERTIN et al., 2011), fazendo com que a presença ou ausência de bactérias que também utilizam esse composto pode ser um fator que contribui para oscilações na detecção de STEC entre as populações de bovinos.

Estudos têm evidenciado variações na composição microbiana fecais de bovinos *super-shedding* e não *super-shedding* (KIM et al., 2017; MIR et al., 2020; SALAHEEN et al., 2019; WANG et al., 2018; XU et al., 2014; ZAHEER et al., 2017). Xu et al. (2014) testaram se a condição de *super-shedding* poderia ser resultado de uma disbiose intestinal e se uma microbiota normal e saudável impediria que *E. coli* O157:H7 colonizasse o trato intestinal de uma maneira que resultaria em animais *super-shedding*. Esses pesquisadores evidenciaram uma diferença na diversidade da microbiota fecal entre animais, os quais os bovinos *super-shedding* exibiram comunidades bacterianas fecais mais diversas do que o gado não *super-shedding*. Desse modo, pode-se hipotetizar que a incidência e a eliminação de STEC podem ser afetadas não apenas pelas características da cepa, mas também pela natureza do microbioma (bactérias, fungos e protozoários) do trato gastrointestinal do hospedeiro.

Alguns estudos propõem alternativas para aumentar a resistência do rebanho à presença desses microrganismos e reduzir a carga microbiana eliminada no ambiente de produção e a carga microbiana levada ao abatedouro, como inclusão de inibidores microbianos em potencial como óleos essenciais, produtos cítricos, ácidos orgânicos, plantas ricas em taninos e compostos fenólicos. Mudanças bruscas na dieta, como o fornecimento de feno dias antes do abate, também têm sido utilizadas como estratégia nutricional com o objetivo de reduzir a colonização, a multiplicação e a disseminação de STEC no rebanho bovino (CALLAWAY et al., 2013b; LEJEUNE; WETZEL, 2007; LONERAGAN; BRASHEARS, 2005; NIU et al., 2009; SARGEANT et al., 2007; STANFORD et al., 2014; STEVENS et al., 2002). Outras estratégias incluem o uso de clorato de sódio, prebióticos e/ou probióticos, antibióticos, vacinação, proteínas antimicrobianas e

bacteriófagos. Além disso, cuidados devem ser tomados no fornecimento de compostos ionóforos para bovinos, devido a inibição de bactérias Gram-positivas e o favorecimento de Gram-negativas (CALLAWAY et al., 2013a, 2013b; USDA-FSIS, 2014).

### 2.3.2. Abate e processamento industrial

O controle nos estabelecimentos de abate e processamento de carne bovina, bem como a prevenção da contaminação do produto final, constitui o ponto principal da cadeia epidemiológica da disseminação de DEC. A contaminação cruzada de produtos alimentícios ao longo da cadeia, envolvendo manipulação das carcaças, mecanização do processamento e logística de distribuição de alimentos é, por sua vez, considerada como fator de risco significativo atribuído a disseminação de patógenos. As práticas de higiene durante o abate, o processamento, embalagem e distribuição de produtos cárneos já estão bem estabelecidas e implementadas por programas como Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. A aplicação correta, a constante atualização e o treinamento da equipe são essenciais para garantir a inocuidade da carne nessas etapas (AIJUKA; BUYS, 2019; BRICHTA-HARHAY et al., 2008; CHAGNOT et al., 2017; RASKO et al., 2011; RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009; SANTOS et al., 2017).

No Brasil, o controle de *E. coli* patogênica nos estabelecimentos de abate ou desossa de bovinos foi inicialmente regulamentado através da Norma Interna DIPOA/SDA nº 2, de 20 de agosto de 2013, que aprovou os procedimentos para a coleta e análise de STEC em carne de bovinos *in natura* utilizada na formulação de produtos cárneos, cominutados, prontos para serem cozidos, fritos ou assados (BRASIL, 2013). Esse controle permitiu a abertura de mercado externo para comercialização de produtos cárneos de origem bovina, principalmente para os Estados Unidos. Atualmente, a legislação vigente que determina diretrizes para o controle microbiológico em carcaça e carne de bovinos em abatedouros frigoríficos, registrados no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal é a Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018). Essa instrução normativa tem como objetivo avaliar a higiene do processo e reduzir a prevalência de agentes patogênicos, como *E. coli* patogênica e *Salmonella*.

Estratégias que estão sendo propostas para auxiliar no controle de *E. coli* patogênica, fazendo com que o animal carregue uma menor contaminação ao abate, se baseiam na redução do tempo em que os animais ficam no curral de espera. Devido à importância do jejum pré-abate na redução do volume do trato gastrointestinal facilitando as operações na evisceração, tem-se recomendado em alguns estudos nos Estados Unidos, que o jejum alimentar pré-abate dos bovinos se inicie no pré-embarque na propriedade rural. Assim, o maior volume de excreção de fezes, que ocorre nas primeiras horas do jejum alimentar, acontecerá na própria fazenda, reduzindo a quantidade de fezes excretadas durante o transporte e a permanência dos animais nos currais de abate (CALLAWAY et al., 2013a; GREGORY et al., 2000; POINTON; KIERMEIER; FEGAN, 2012; USDA-FSIS, 2014).

Dentro do ambiente industrial, a remoção do couro durante a esfolagem é considerada como uma etapa crítica para contaminação da carne bovina, decorrente da contaminação cruzada que pode ocorrer quando há falha na operação transferindo microrganismos do couro do animal para a carcaça (CHAGNOT et al., 2017). Nesse sentido, intervenções focadas no couro têm sido propostas para conter a contaminação por STEC, como depilação e lavagens com água, uso de vapor, produtos químicos, ácidos orgânicos e bacteriófagos (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011). Alguns autores propõem a utilização desses compostos diretamente na carcaça, assim como o uso de biocidas oxidativas, plasma atmosférico frio, irradiação por feixes de elétrons, irradiação por luz ultravioleta (UV), combinação de luz UV e ozônio e processamento de alta pressão, uma vez que essas alternativas têm se mostrado eficazes na redução das populações de *E. coli* patogênicas em produtos cárneos (WANG et al., 2017; WHEELER; KALCHAYANAND; BOSILEVAC, 2014).

### 2.3.3. Consumidores

Estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, mostram que STEC é responsável por causar mais de 265.000 casos a cada ano no país (CDC, 2018). A maioria das pessoas doentes com STEC O157 se recupera sem ser hospitalizada sendo que, aproximadamente, 2.100 casos da doença apresentam necessidade de hospitalização; em 15% desses casos, os rins são afetados

podendo resultar em diálise contínua, transplante renal e morte (USDA ERS, 2015). Na Argentina, a incidência de SHU chega a ser 10 vezes maior que em outros países industrializados (13,9 casos/100.000 crianças menores que 5 anos) (LEOTTA et al., 2008). No Brasil, não há relatos de surtos confirmados de transmissão alimentar envolvendo STEC (CASTRO et al., 2019a), embora casos esporádicos de infecções humanas tenham sido descritos na literatura (BASTOS et al., 2006; ORI et al., 2019; SOUZA, 2011; VAZ et al., 2006).

O saneamento básico adequado é considerado uma estratégia eficaz de prevenção de DEC, visto que, principalmente em países em desenvolvimento, as taxas mais altas de infecção e doença ocasionadas por esses agentes microbianos estão relacionadas à precariedade desse sistema (AIJUKA; BUYS, 2019). Educação sanitária em boas práticas de manipulação em restaurantes, bares, residências, enfatizando a necessidade da lavagem frequente das mãos e áreas de superfície de contato com os alimentos, separação de alimentos durante o armazenamento e a preparação para evitar contaminação cruzada, temperaturas de cozimento adequadas para destruir os patógenos que possam estar presentes e refrigeração imediata dos alimentos adquiridos e sobras, fazem parte da prevenção dos surtos decorrentes da ingestão de patótipos de DEC, fechando o ciclo *from farm to fork* (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Um estudo realizado na França, atribuiu às práticas inadequadas de manipulação de alimentos na etapa final de preparação o fator principal para ocorrência de doenças decorrente da ingestão de alimentos contaminados, e que a implementação de boas práticas de higiene nessa fase poderia reduzir essas doenças em 67-85% (principalmente com a prevenção de contaminação cruzada, cozimento e armazenamento adequados). A importância do papel dos consumidores também é confirmada por dados de investigações da origem dos surtos alimentares. Cerca de um terço dos surtos de origem alimentar relatados ocorrem dentro dos domicílios (AUGUSTIN et al., 2020; SANTÉ PUBLIQUE FRANCE, 2018). Outro aspecto que exerce influência na ocorrência de doenças decorrente da ingestão de alimentos contaminados são os hábitos culturais e religiosos e os padrões e as preferências alimentares das pessoas em todo o mundo (MENDONÇA; THOMAS-POPO; GORDON, 2020).

O CDC também baseia suas orientações para prevenção da infecção causada por *E. coli* patogênica através das boas práticas de manipulação de

alimentos e higiene pessoal. As principais orientações são: higienização adequada dos manipuladores de alimentos, especialmente boa lavagem das mãos; higienização adequada de frutas e vegetais; certificação do preparo adequado de produtos cárneos, onde carne moída bovina, suína e de cordeiro devem ser submetidas a um tratamento térmico mínimo de 70 °C, sendo que a utilização de um termômetro para alimentos, principalmente em hambúrgueres, é a melhor forma verificar se a carne atingiu a temperatura interna segura; consumo de carne crua/mal cozida, leite cru, laticínios não pasteurizados e sucos não pasteurizados devem ser evitados; atenção para a contaminação cruzada, onde o manipulador deve manter mãos, balcões, tábuas de cortar e utensílios adequadamente higienizados com água e sabão depois de tocarem em carne crua; cuidados com água não tratada e de recreação em lagos, lagoas, riachos e piscinas devem ser considerados (CDC, 2020).

Conhecer a epidemiologia das cepas de DEC na cadeia produtiva da carne bovina, após sua comercialização e o modo de preparo são fatores principais de proteção ao consumidor. Em cortes inteiros da carne bovina, a contaminação tende a ser superficial, de forma que *E. coli* pode ser facilmente destruída pelo cozimento. Já a carne bovina cominuída é considerada um produto de alto risco devido à disseminação da contaminação para o interior do produto. Assim, a carne moída representa um importante veículo de DEC, principalmente na forma de hambúrgueres, almôndegas e bolos de carne pois são, muitas vezes, consumidos de forma mal passada (SMITH; FAZIL; LAMMERDING, 2013).

Apesar das recomendações das autoridades de segurança dos alimentos sobre o uso de termômetros para medir a temperatura interna dos hambúrgueres, a maioria dos consumidores continuam avaliando o grau de cozimento através das características sensoriais, como cor ou textura e/ou tempo de cozimento da carne bovina. Røssvoll et al. (2014) fizeram um levantamento sobre as preferências dos consumidores com relação aos hambúrgueres cozidos. Os entrevistados, em sua maioria, disseram que confia na cor interna do hambúrguer, na cor da superfície do hambúrguer ou na cor do suco liberado dos hambúrgueres durante cozimento para determinar seu grau de cozimento, não sendo o uso do termômetro uma prática comum (apenas 0,2% dos entrevistados afirmaram usar termômetro para verificar se o hambúrguer estava bem passado durante preparo em casa). Em outro estudo, aproximadamente 67% dos entrevistados indicaram que determinam o cozimento de



hambúrgueres de carne moída por observação visual, 18% identificam o cozimento considerando o tempo de cozimento e 13,5% usam termômetro de carne (RAMANATHAN et al., 2019).

Ainda, a preferência de muitos consumidores por hambúrgueres mal cozidos exacerba o risco à ocorrência de doença decorrente da ingestão de alimentos contaminados (RØSSVOLL et al., 2014). Desse modo, o *Food and Drug Administration*, através do Código Alimentar (FDA, 2017), estipula que quando um alimento de origem animal for servido cru, mal passado ou insuficientemente processado para eliminar patógenos, o restaurante deve divulgar nos cardápios e com cartazes para lembrar aos consumidores do risco. O aviso aos consumidores também pode incluir a ressalva de que esse risco é especialmente aumentado quando um indivíduo tem uma condição médica específica. Além das campanhas de vários órgãos de saúde para o correto preparo desses alimentos em casa (CANADA, 2018; CDC, 2020; ECDC, 2020; FDA, 2020; WHO, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga e demais patótipos de *E. coli* diarreio gênica em bovinos provenientes do sistema extensivo e sistema intensivo de criação e em diferentes etapas de abate e processamento da carne bovina.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

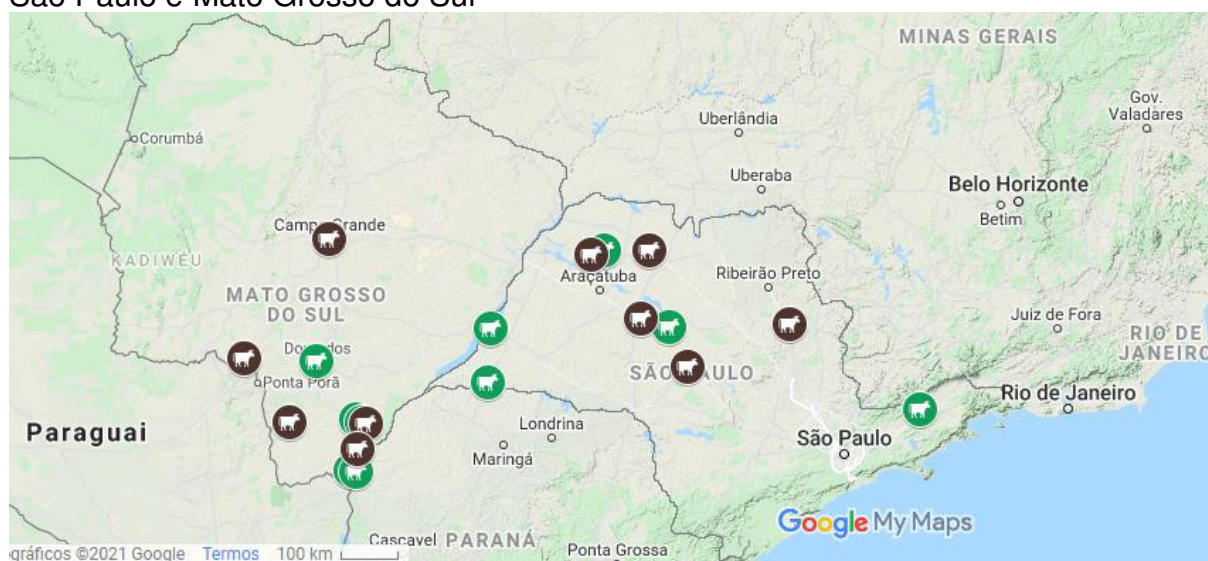
- Isolar *E. coli* de bovinos provenientes de dois tipos de criação (extensiva e intensiva) e de diferentes etapas em dois abatedouros frigoríficos de bovinos;
- Classificar os patótipos de *E. coli* diarreio gênica entre os isolados obtidos na espécie bovina detectando a frequência dos patótipos nos dois tipos de criação de bovinos e nos abatedouros frigoríficos;
- Caracterizar os isolados de EPEC e STEC de acordo com determinantes genéticos de virulência;
- Determinar o filogrupo genético de *E. coli* diarreio gênica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram obtidas, entre maio a setembro de 2019, em dois abatedouros frigoríficos inspecionados pelo Ministério da Agricultura do Brasil (MAPA, Brasília, DF, Brasil), sendo um abatedouro localizado no estado de São Paulo (capacidade de abate de 130 bovinos por hora; 676 m<sup>2</sup> de área total da sala de abate) e um abatedouro localizado no estado do Mato Grosso do Sul (capacidade de abate de 160 bovinos por hora; 640 m<sup>2</sup> de área total da sala de abate). Em cada abatedouro foram selecionados dez lotes: cinco lotes de fazendas que produziam gado em sistema extensivo (animais terminados a pasto) e outros cinco lotes de fazendas que produziam em sistema intensivo (animais terminados confinados) (Figura 4).

**Figura 4** – Distribuição das fazendas de criação bovina amostradas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

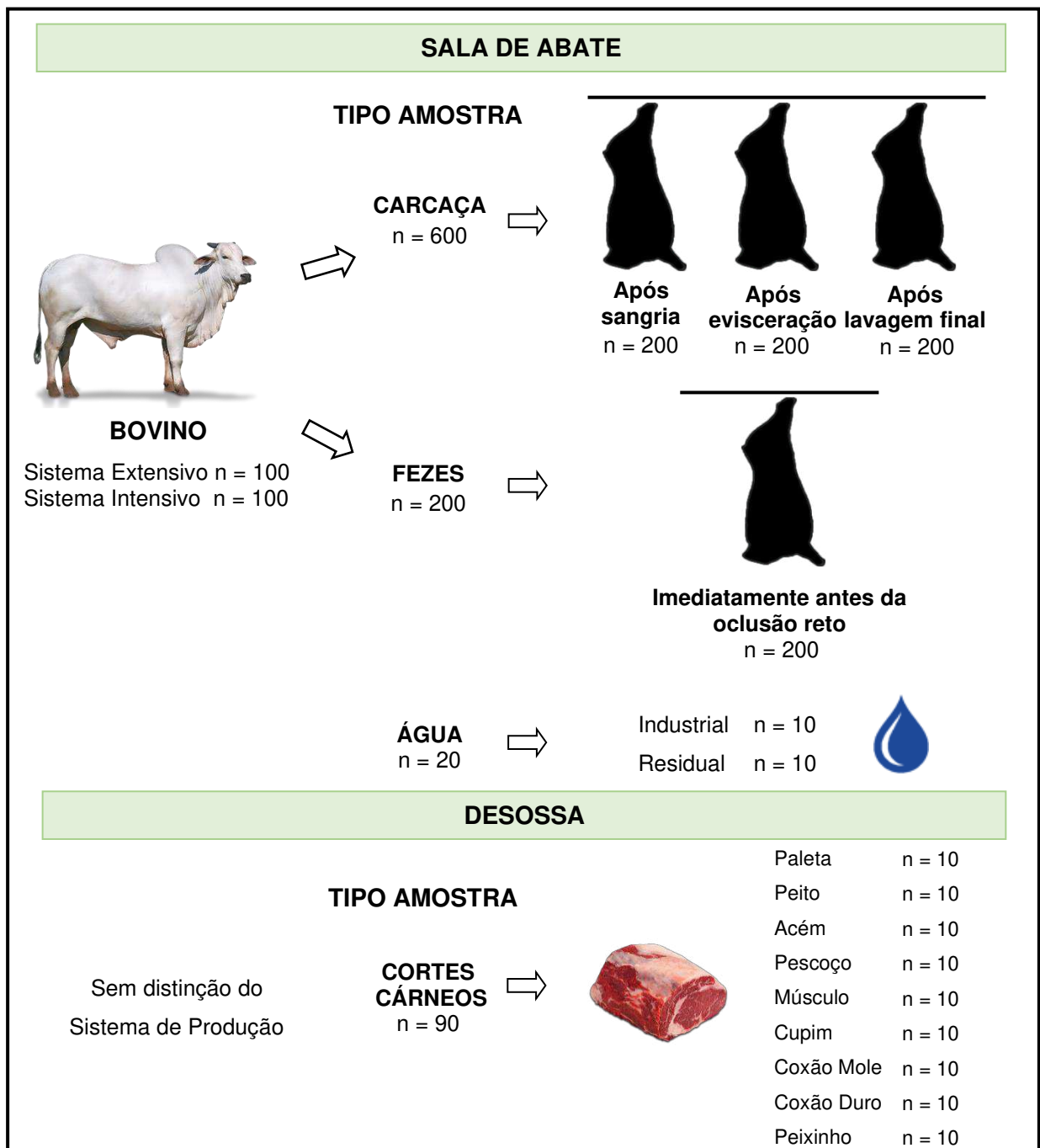


Legenda: Localização das fazendas de criação bovina a pasto (marcador verde) – Municípios de Naviraí, Eldorado e Dourados no Mato Grosso do Sul e municípios de Presidente Epitácio Teodoro, Sampaio, Pongai, General Salgado e Pindamonhangaba em São Paulo; Localização das fazendas de criação bovina confinado (marcador marrom) – Municípios de Itaquiraí, Naviraí, Amambai, Campo Grande e Antônio João no Mato Grosso do Sul e município de Bauru, Auriflana, Santa Rita do Passa Quatro, Guaiaçara e Tanabi em São Paulo. Fonte: Google My Maps.

Dez animais foram amostrados aleatoriamente em cada lote, todos machos, da raça Nelore ou mestiços Nelore e Angus e peso médio de carcaça de 300 kg. Esses animais foram amostrados em etapas distintas do abate: amostras de

carcaças foram obtidas após sangria, após evisceração e após lavagem final; amostras de fezes foram obtidas imediatamente antes da oclusão do reto. Ainda, foram coletadas amostras de água industrial na sala de abate e residual, proveniente da lavagem final das carcaças, e amostras de cortes cárneos, totalizando 910 amostras (Figura 5).

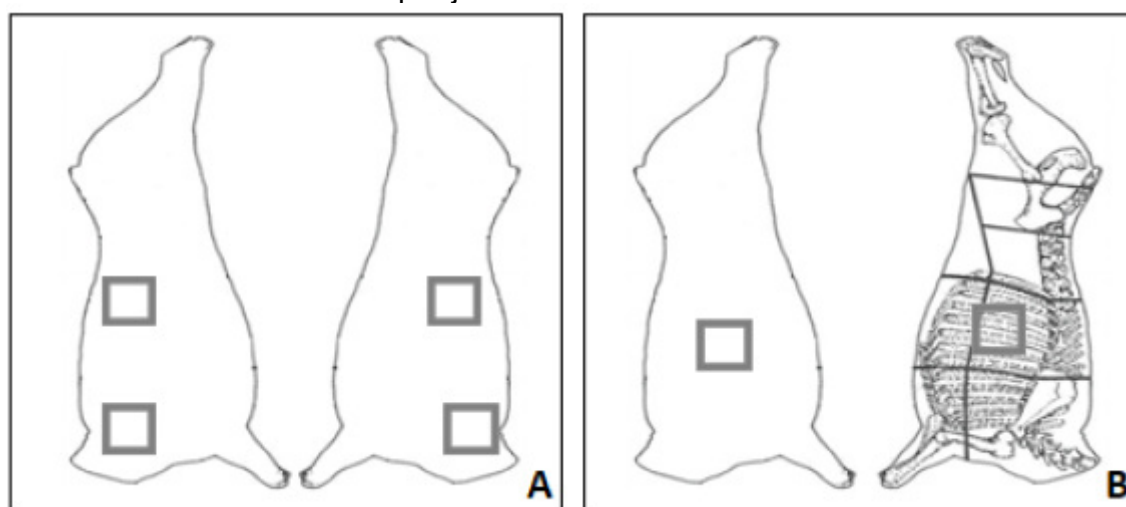
**Figura 5** – Amostras coletadas em dois abatedouros frigoríficos de bovinos entre maio e setembro de 2019



Fonte: A autora.

Amostras de carcaças e cortes cárneos foram obtidas através de *swab* de superfície de quatro áreas limitadas por moldes estéreis de 10 x 10 cm (100 cm<sup>2</sup>) totalizando 400 cm<sup>2</sup> (Figura 6), com esponjas estéreis pré-umedecidas com 10 mL de NaCl 0,85% (p/v); as fezes foram coletadas com *swab* estéril e transportadas em meio *Cary Blair*; a água foi amostrada coletando um volume de 100 mL de cada amostra. Todas as amostras foram mantidas em refrigeração até a análise.

**Figura 6** – Representação esquemática dos pontos coletados nas carcaças bovinas antes (A) e após (B) separação em meias carcaças, com a indicação dos locais amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm<sup>2</sup>



Fonte: A autora.

#### 4.2. DETECÇÃO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA

Para detecção de STEC, foi utilizada a metodologia descrita pela ISO 13.136 (ISO, 2012) com modificações. Para cada amostra de carcaça e corte cárneo, as esponjas foram transferidas para um saco estéril contendo 180 mL de água peptonada tamponada (APT, Oxoid) e homogeneizadas a 230 rpm por 1 min (Stomacher 400®, Seward, Reino Unido), seguido de incubação por 24 h a 36 °C. Para a água, alíquotas de 25 mL foram transferidas para 225 mL de APT, homogeneizadas e incubadas a 36 °C por 24 h. Para as amostras de fezes, os *swabs* foram incubados em 10 mL de APT a 36 °C por 24 h. Alíquotas de 400 µL de cada APT incubado foram submetidos à extração de DNA utilizando alta temperatura (100 °C/ 10 minutos) para rompimento da parede bacteriana e liberação de material genético (CHAPMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-GARCÍA et al., 2019). O DNA foi submetido à uma *stx*-PCR contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 0,4

$\mu\text{M}$  do par de *primers* (sequências dos *primers*, tamanhos dos produtos e condições das reações estão detalhados no Anexo A), 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 16  $\mu\text{L}$ . Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese com agarose 2% (p/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

As amostras positivas para o gene *stx* (n = 274) foram cultivadas em MacConkey Sorbitol (Oxoid), adicionado de cefixima (0,05 mg/L) e telurito (2,5 mg/L) (CT-SMAC), e incubadas a 35 °C por 24 h. Após incubação, cinco colônias fermentadoras de sorbitol e cinco não fermentadoras de sorbitol foram submetidas a testes para identificação e confirmação de *E. coli*.

#### 4.3. DETECÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

Em paralelo, todas amostras foram semeadas em ágar MacConkey (MAC, Oxoid) para o isolamento e identificação dos patótipos de *E. coli* diarreiogênica. A partir do APT incubado (com exceção das amostras de fezes dos animais, que antes de serem submetidas à incubação em APT, foram semeados diretamente no ágar MAC), uma alíquota foi submetida à semeadura por superfície em ágar MAC, e após incubação a 36 °C por 24 h, quatro colônias com fermentação de lactose e uma sem fermentação de lactose foram submetidas a testes para identificação e confirmação de *E. coli* (FENG et al., 2020; PROCOP et al., 2017; TIMM et al., 2007).

#### 4.4. CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli*

Todos os isolados obtidos do ágar CT-SMAC (n = 2092) e todos os isolados obtidos do ágar MAC (n = 2970) foram submetidos aos testes fenotípicos para confirmação e identificação de *E. coli* (testes IMViC - Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato) (FENG et al., 2020; PROCOP et al., 2017; TIMM et al., 2007) (Quadro 1).

**Quadro 1** – Testes bioquímicos utilizados para identificação e confirmação de *Escherichia coli*

<b>Teste Bioquímico</b>	<b>Incubação</b>	<b>Interpretação</b>
Teste do Citrato	36 °C/ 96 h	Negativo
Teste do Indol	36 °C/ 24 h	Positivo
Teste Vermelho de Metila	36 °C/ 48 h	Positivo
Teste Voges-Proskauer	36 °C/ 48 h	Negativo

Isolados que apresentaram divergência na avaliação do perfil bioquímico, isolados não fermentadores de lactose em ágar MAC e alguns isolados com características típicas de *E. coli* (n = 454) foram selecionados para identificação molecular por PCR através da pesquisa do gene *uspA*, conforme descrito por Chen e Griffiths (1998). Resumidamente, após incubação dos isolados em caldo infusão cérebro coração (BHI, Oxoid) (36 °C/18-24 h), uma alíquota de 400 µL foi submetida à extração de DNA em alta temperatura (100 °C/10 minutos), para ruptura da parede bacteriana e liberação de material genético (CHAPMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-GARCÍA et al., 2019). O DNA foi submetido à uma PCR contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 1 µM do par de *primers* (Anexo A), 4,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 20 µL. Para observação dos resultados das amplificações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

#### 4.4.1. Confirmação de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Todos os isolados obtidos do ágar CT-SMAC identificados como *E. coli* (n = 1039) foram submetidos à confirmação de STEC por *stx*-PCR. A extração de DNA foi realizada utilizando alta temperatura (100 °C/10 minutos) para rompimento da parede bacteriana e liberação de material genético (CHAPMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-GARCÍA et al., 2019). Na sequência, o DNA foi submetido à uma PCR *simplex* (conforme descrito no item 4.2). Para observação dos resultados das amplificações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

#### 4.4.2. Confirmação de *Escherichia coli* diarreio gênica

Os isolados obtidos do ágar MAC e identificados como *E. coli* (n = 1740) foram submetidos à confirmação de DEC por PCR através dos marcadores de virulência de cada patotipo: gene *stx* (STEC); gene *eae* (EPEC); gene *ipaH* (EIEC); gene *est* e *elt* (ETEC); gene *aggR* (EAEC). Os isolados foram cultivados em BHI a 36 °C por 18-24 h e, em seguida, o DNA foi extraído em alta temperatura (100 °C/10 minutos) (CHAPMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-GARCÍA et al., 2019). Após extração, o DNA obtido foi submetido ao protocolo de PCR *multiplex* direcionado aos genes *eae*, *stx*, *ipaH* e *aggR*. Resumidamente, após extração, o DNA foi submetido à uma PCR contendo GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,25 µM dos *primers* SK1, SK2, VT com-u, VT com-d, AggRk-s1 e AggRk-as2 e 0,125 µM dos *primers* ipaIII e ipaIV (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 16 µL. Para observação dos resultados das ampliações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

Os isolados que não apresentaram nenhum desses genes (n = 1588) foram submetidos à identificação de ETEC através dos genes *est* e *elt* (TOMA et al., 2003) por meio de PCR *simplex* contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 0,5 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 20 µL. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese com agarose 1,5% (p/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE EPEC E STEC

Para classificação dos isolados de EPEC em cepas típicas ou atípicas, o gene *bfpA* (*bundle-forming pilus*), que está presente na tEPEC, foi pesquisado em todos isolados obtidos (n = 11) conforme descrito por Toma et al. (2003). O DNA foi submetido à uma PCR contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 0,4 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 16 µL. Os produtos de PCR foram submetidos à



eletroforese com agarose 1,5% (p/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

Os isolados de STEC (n = 251) foram classificados de acordo com o gene envolvido na codificação da toxina de Shiga (gene *stx1* e *stx2*) (BAI; SHI; NAGARAJA, 2010; FAGAN et al., 1999) e quanto à presença do gene *eae* (TOMA et al., 2003). Para detecção do gene *stx*, a partir do DNA extraído, foram realizados dois testes de PCR, uma para detecção do gene *stx1* e outro para detecção do gene *stx2*. Ambas reações contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 0,2 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 16 µL. Para detecção do gene *eae*, foi realizada uma PCR contendo GoTaq® Green Master Mix (Cellco Biotec), 0,4 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 16 µL. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese com agarose 1,5% (p/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

#### 4.6. GRUPO FILOGENÉTICO

O grupo filogenético foi avaliado de acordo com Clermont et al. (2013) e Doumith et al. (2012). Todos os isolados identificados como DEC (n = 270) foram testados inicialmente para os genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e *TSPE4.C2*. A partir do DNA extraído, foi realizado o teste de PCR *multiplex* contendo GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,8 µM de cada *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 20 µL. Para observação dos resultados das ampliações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador. Para interpretação dos resultados obtidos foi utilizada a árvore decisória proposta por Clermont et al. (2013) (Anexo B).

Os isolados que foram classificados como filogrupo “D ou E” (n = 23) e “E ou Clade I” (n = 10), foram submetidos a um segundo teste de PCR para dar continuidade à classificação do filogrupo utilizando o *primer* ArpAgpCE, que é um *primer* filogrupo E específico. A partir do DNA extraído, foi realizado uma PCR contendo GoTaq Green Master Mix (Cellco Biotec), 1,0 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume

final de 20 µL. Para observação dos resultados das amplificações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

Os isolados que foram classificados nos filogrupos “A ou C” (n = 6) foram submetidos a nova PCR com o *primer* TrpAgpC, que é um primer filogrupos C específico. A partir do DNA extraído, foi realizada uma PCR contendo GoTaq Green Master Mix (Cellco Biotec), 1,0 µM do par de *primers* (Anexo A), 2,0 µL de DNA e água ultrapura para PCR (Promega) para completar o volume final de 20 µL. Para observação dos resultados das amplificações, o produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (g/v) diluído em tampão de 0,5 X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com UniSafe Dye® em transiluminador.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, os resultados da presença de *E. coli* patogênica foram expressos em frequências de positividade para cada patotipo e submetidos ao teste do Qui-quadrado, sendo que nas comparações realizadas onde a frequência esperada calculada foi menor que cinco foram submetidos ao teste exato de Fisher. A análise foi realizada por meio do *software RStudio*. Para todas as análises, foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A caracterização dos isolados e a frequência dos filogrupos foram avaliados na forma descritiva.

## 5. RESULTADOS

No total das 910 amostras coletadas, 94 foram positivas para algum tipo de DEC. Destas, doze (12,8%) amostras foram de carcaça, sendo após sangria o ponto com maior isolamento, e 82 (87,2%) amostras de fezes. Não foram detectadas amostras de cortes cárneos e de água positivas para *E. coli* patogênica pela metodologia utilizada (Tabela 2).

**Tabela 2** – Frequência de *Escherichia coli* patogênica de acordo com o tipo de amostra coletada em frigoríficos de bovinos em dois abatedouros frigoríficos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Parâmetro	STEC	EIEC	EPEC	Total
<b>Carcaça – Etapas de abate</b>				
Após Sangria	8/200 (4,0%) <sup>A;a</sup>	0/200 (0,0%) <sup>B;a</sup>	1/200 (0,5%) <sup>B;a</sup>	9/200 (4,5%) <sup>a</sup>
Após Evisceração	1/200 (0,5%) <sup>A;b</sup>	0/200 (0,0%) <sup>A;a</sup>	0/200 (0,0%) <sup>A;a</sup>	1/200 (0,5%) <sup>b</sup>
Após Lavagem Final	1/200 (0,5%) <sup>A;b</sup>	1/200 (0,5%) <sup>A;a</sup>	0/200 (0,0%) <sup>A;a</sup>	2/200 (1,0%) <sup>ab</sup>
<b>Tipo de amostra</b>				
Carcaça	10/600 (1,7%) <sup>A;b</sup>	1/600 (0,2%) <sup>B;b</sup>	1/600 (0,2%) <sup>B;b</sup>	12/600 (2,0%) <sup>b</sup>
Fezes	71/200 (35,5%) <sup>A;a</sup>	7/200 (3,5%) <sup>B;a</sup>	4/200 (2,0%) <sup>B;a</sup>	82/200 (41,0%) <sup>a</sup>
Corte Carne	0/90 (0,0%) <sup>-</sup>	0/90 (0,0%) <sup>-</sup>	0/90 (0,0%) <sup>-</sup>	0/90 (0,0%) <sup>-</sup>
Água	0/20 (0,0%) <sup>-</sup>	0/20 (0,0%) <sup>-</sup>	0/20 (0,0%) <sup>-</sup>	0/20 (0,0%) <sup>-</sup>
<b>Total</b>	<b>81/910 (8,9%)</b>	<b>8/910 (0,9%)</b>	<b>5/910 (0,5%)</b>	<b>94/910 (10,3%)</b>

Legenda – Letras maiúsculas: frequências analisadas na linha com mesma letra não diferem estatisticamente, enquanto que letras diferentes diferem estatisticamente. Letras minúsculas: frequências analisadas na coluna de cada parâmetro com mesma letra não diferem estatisticamente, enquanto que letras diferentes diferem estatisticamente. STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; EPEC: *E. coli* enteropatogênica.

Das 94 amostras positivas para DEC, 81 foram positivas para STEC, sendo dez amostras de carcaça e 71 amostras de fezes; oito foram positivas para EIEC, sendo uma amostra de carcaça e sete amostras de fezes; cinco foram positivas para EPEC, sendo uma amostra de carcaça e quatro amostras de fezes (Tabela 2). Não foram encontradas amostras positivas para EAEC e ETEC. Não foi encontrado mais de um patotipo em uma mesma amostra de carcaça e em apenas duas amostras de fezes foram encontradas EIEC e STEC simultaneamente.

Quando a frequência de animais portadores de STEC foi comparada, verificou-se um maior isolamento entre os animais criados de forma extensiva. Desse modo, foi possível verificar através dos dados que houve evidência estatística de que o isolamento de STEC nos animais está associado ao sistema de criação,

sendo que o sistema de criação a pasto apresenta maior contaminação ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Entre as amostras de fezes, foi possível encontrar o gene *stx* em 88 das 100 amostras de bovinos do sistema extensivo, sendo que em 48 dessas amostras foi possível o isolamento do agente, enquanto o gene *stx* foi detectado em 67 das 100 amostras de fezes de bovinos do sistema intensivo, porém STEC foi isolada em apenas 23 dessas amostras.

**Tabela 3** – Comparação das frequências de *Escherichia coli* patogênica entre dois sistemas de criação de bovinos em amostras de carcaças e fezes obtidas em abatedouros frigoríficos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Patógeno*	Amostra	Tipo de Criação	
		A pasto	Confinado
STEC	Carcaça	8/300 (2,7%) <sup>a</sup>	2/300 (0,7%) <sup>a</sup>
	Fezes	48/100 (48,0%) <sup>a</sup>	23/100 (23,0%) <sup>b</sup>
EIEC	Carcaça	0/300 (0,0%) <sup>a</sup>	1/300 (0,3%) <sup>a</sup>
	Fezes	1/100 (1,0%) <sup>a</sup>	6/100 (6,0%) <sup>a</sup>
EPEC	Carcaça	0/300 (0,0%) <sup>a</sup>	1/300 (0,3%) <sup>a</sup>
	Fezes	0/100 (0,0%) <sup>a</sup>	4/100 (4,0%) <sup>a</sup>

Frequências analisadas na linha com mesma letra não diferem estatisticamente, quanto que letras diferentes diferem estatisticamente. \* STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; EPEC: *E. coli* enteropatogênica.

Quanto à frequência das amostras positivas, verificou-se que STEC foi significativamente mais frequente nas amostras de fezes do que nas amostras de carcaças ( $p < 0,05$ ), onde o ponto com maior isolamento nas carcaças foi após sangria, sendo significativamente maior quando comparado aos demais pontos de amostragem das carcaças ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Das dez carcaças contaminadas por STEC, sete foram provenientes de animais portadores do patotipo e três amostras de carcaças não foram correlacionadas aos bovinos portadores do patotipo, no entanto, outros bovinos da mesma fazenda apresentaram-se como portadores. Em amostras de cortes e água não foi isolada STEC, apesar de algumas amostras terem apresentado o gene *stx* na etapa de triagem.

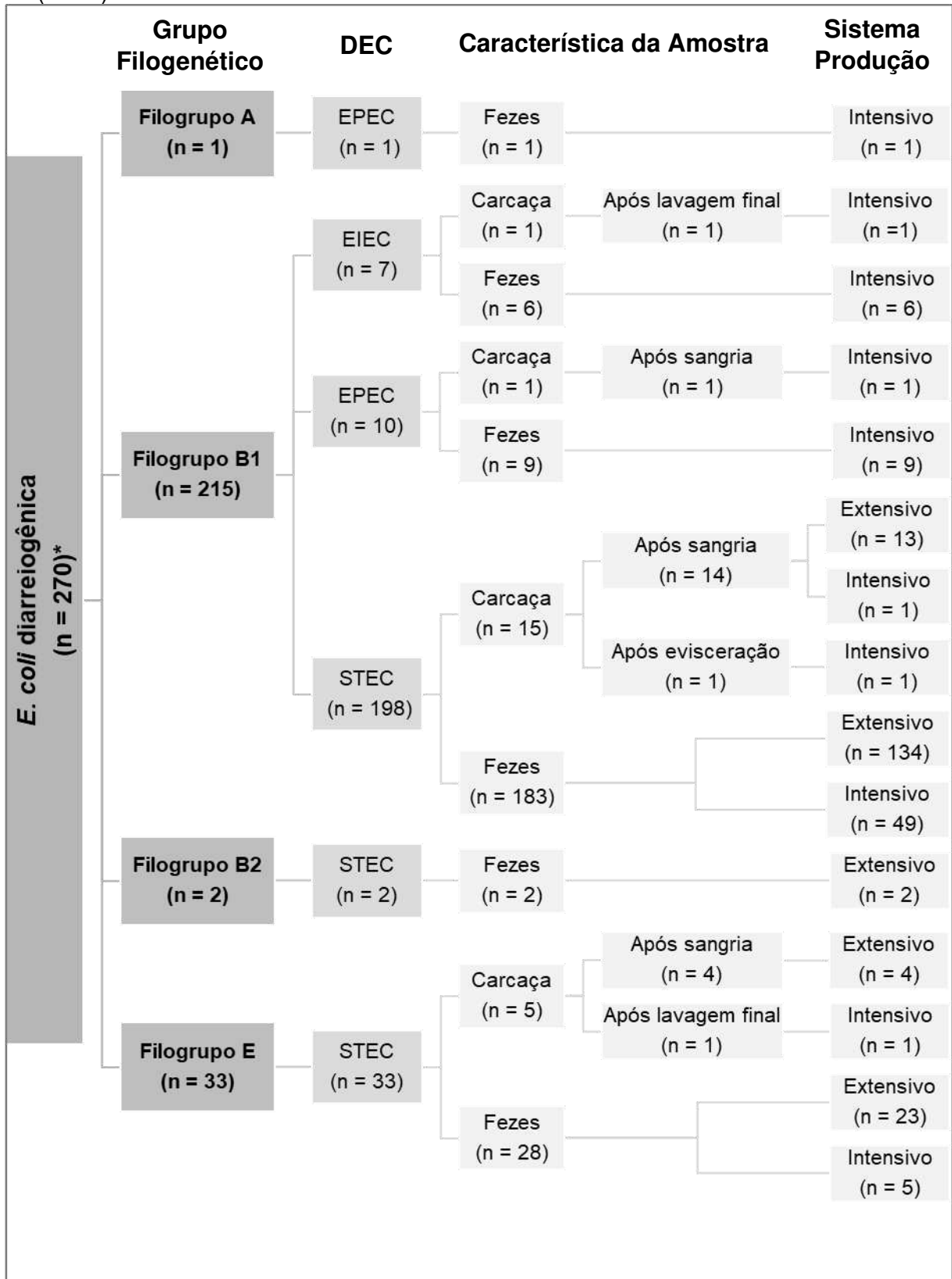
Não foram encontradas evidências estatísticas que a frequência de EIEC ( $p > 0,05$ ) e de EPEC ( $p > 0,05$ ) nos animais está associada ao sistema de criação (Tabela 3). Assim como não houve diferença no isolamento de EIEC e EPEC em relação ao ponto amostrado da carcaça ( $p > 0,05$ ). No entanto, foi possível verificar que o tipo de amostra influenciou no isolamento desses patógenos, sendo que as

amostras de fezes apresentaram estatisticamente uma maior contaminação, tanto para EIEC ( $p < 0,05$ ) como para EPEC ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

De acordo com a confirmação bioquímica e classificação dos isolados utilizando os marcadores de virulência de cada DEC, foram obtidos 251 isolados confirmados como STEC, sendo 231 obtidos de fezes e 20 de carcaças. Todos os isolados identificados como STEC foram submetidos à classificação do gene *stx*, onde foi possível observar que três (1,2%) isolados carreavam o gene *stx1*, 148 (59,0%) carreavam o gene *stx2* e 85 (33,9%) carreavam ambos *stx1* e *stx2* (quinze isolados não apresentaram especificidade com o gene *stx1* ou *stx2*). O gene *eae* também foi pesquisado entre esses isolados e foi detectada em 22 (8,8%) STEC, dezessete isoladas de fezes e cinco de carcaças, onde 86,4% das amostras positivas para STEC *eae+* eram de animais provenientes do sistema extensivo de produção. Ainda, oito isolados foram confirmados como EIEC, sendo sete isolados de fezes e um de carcaça; onze isolados foram confirmados como EPEC, sendo dez em amostra de fezes e um na carcaça. Nenhum desses isolados de EPEC apresentou resultado positivo para *bfp*, sendo classificados como aEPEC.

Os dados relacionados aos grupos filogenéticos foram determinados usando o esquema de fluxo descrito por Clermont et al. (2013). Dentre os 270 isolados (STEC, EIEC e EPEC) o grupo B1 (79,6%) foi o mais frequente, seguido pelos grupos E, B2 e A (Figura 07). O único isolado de EPEC classificado no filogrupo A foi obtido de uma amostra de fezes de animal criado em confinamento. Nos demais filogrupos, predominou-se isolados obtidos de amostras de fezes de animais criados extensivamente. A maioria dos isolados de STEC foram classificados como filogrupo B1, no entanto, todos os isolados STEC *eae+* ( $n = 22$ ) foram classificados dentro do filogrupo E. As demais STEC do filogrupo E ( $n = 11$ ) foram isoladas de amostras de fezes e a maioria de animais provenientes do sistema extensivo de criação.

**Figura 7** – Frequências de grupo filogenético de isolados de *Escherichia coli* diarreio gênica obtidos de diferentes amostras de dois abatedouros frigoríficos de bovinos localizados em São Paulo e Mato Grosso do Sul de acordo com Clermont et al. (2013)



\*Dezoito cepas de STEC e uma de EIEC apresentaram uma classificação inconclusiva/desconhecida.

Fonte: A autora.

## 6. DISCUSSÃO

Do total das amostras contaminadas por algum tipo de DEC, 87,2% eram amostras de fezes de bovinos. O isolamento de DEC nas carcaças durante os procedimentos de abate foi baixo e não foi isolado nenhum patótipo de DEC nos cortes finais de carne (Tabela 02). Está bem estabelecido que DEC pode ser transportado pelos animais de produção aos estabelecimentos de abate e pode ser transferido para carcaças de bovinos e, posteriormente, para a carne durante seu processamento. As principais etapas durante o abate que podem predispor a uma contaminação são a esfolagem e a evisceração. Uma vez ocorrendo falha de operação nessas etapas, ela pode ser responsável pela contaminação do produto final (BRICHTA-HARHAY et al., 2008; CHAGNOT et al., 2017; PRATA et al., 2013; SANTOS et al., 2017).

Com base na cadeia epidemiológica da disseminação de DEC na produção de carne bovina, era esperado que o seu isolamento nas amostras de fezes fosse maior do que nas amostras de carcaças. Ao observar as frequências de DEC nos animais e nas carcaças, pode-se sugerir que quanto maior a frequência de animais portadores do patógeno maior a chance de contaminação ao longo do processo de abate. Das doze carcaças contaminadas por algum patótipo de DEC, 83,3% apresentaram STEC que, por sua vez, foi o patótipo mais isolado entre os animais na pesquisa (Tabela 02). Todas carcaças contaminadas por STEC foram provenientes de lotes em que pelo menos um dos bovinos foi positivo para o patótipo na amostra de fezes, sendo que em sete carcaças positivas esse patótipo também foi isolado nas amostras de fezes do mesmo animal.

No entanto, mesmo com uma frequência alta nas fezes, o controle nos abatedouros foi efetivo, permitindo a redução ao longo do abate e a ausência do patógeno no produto final. Essas observações reforçam a necessidade de adoção de estratégias visando a redução de contaminação e disseminação entre os animais reduzindo, dessa forma, a carga bacteriana que chega aos abatedouros, associado ao controle nos estabelecimentos de abate e processamento de carne bovina. Um relaxamento no controle higiênico-sanitário dos procedimentos de abate pode favorecer que a contaminação por DEC chegue ao produto final.

A implementação de estratégias de redução de patógenos nos animais no campo tem o potencial de diminuir doenças humanas por reduzir o número de

patógenos que entram no ambiente industrial, além da redução da carga bacteriana patogênica no campo, reduzindo o risco de disseminação entre os animais, meio ambiente e produtores. A presença de STEC no couro de bovinos está fortemente associada à presença da bactéria nas fezes, indicando que as intervenções para reduzir a eliminação fecal do microrganismo devem reduzir a contaminação da carcaça através do couro (LONERAGAN; BRASHEARS, 2005). Alguns estudos propõem alternativas para aumentar a resistência do rebanho à presença principalmente de STEC como inclusão de inibidores microbianos em potencial, como óleos essenciais, produtos cítricos, ácidos orgânicos, plantas ricas em taninos e compostos fenólicos. Mudanças bruscas na dieta, como o fornecimento de feno dias antes do abate, também tem se mostrado efetivo na redução da disseminação de STEC no rebanho bovino. Outras estratégias incluem o uso de clorato de sódio, prebióticos e/ou probióticos, antibióticos, vacinação e bacteriófagos (CALLAWAY et al., 2013b; LEJEUNE; WETZEL, 2007; LONERAGAN; BRASHEARS, 2005; NIU et al., 2009; SARGEANT et al., 2007; STANFORD et al., 2014; STEVENS et al., 2002).

No ambiente industrial, a contaminação cruzada de produtos alimentícios ao longo da cadeia, envolvendo manipulação das carcaças, mecanização do processamento e logística de distribuição de alimentos é, por sua vez, considerada como fator de risco significativo atribuído a disseminação de DEC. Algumas etapas são mais relevantes na disseminação de *E. coli* patogênica ao longo do abate e processamento da carne bovina. O período pré-abate tem sido considerado crítico para a disseminação de STEC, pois envolve situações como jejum alimentar e dieta hídrica, mistura de lotes, aumento da densidade animal, manejo que não são comuns como embarque na fazenda e desembarque no abatedouro. Essas alterações aumentam o estado de estresse, com alteração da homeostase do organismo do animal, podendo favorecer a multiplicação e disseminação de patógenos (DUFFY; BURGESS; BOLTON, 2014). Ainda, o couro dos bovinos durante o período de “descanso” no curral de espera está mais suscetível à contaminação devido à concentração de animais, deste modo, pode favorecer o aumento na carga de contaminação que será levada para dentro do estabelecimento de abate (CALLAWAY et al., 2013a; USDA-FSIS, 2014).

Práticas de higiene durante o abate, o processamento, a embalagem e a distribuição de produtos cárneos devem fazer parte da rotina dos estabelecimentos, sendo determinadas e implementadas por programas como Boas Práticas de



Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. A aplicação correta, a constante atualização e o treinamento da equipe são essenciais para garantir a inocuidade da carne nessas etapas (AIJUKA; BUYS, 2019; BRICHTA-HARHAY et al., 2008; CHAGNOT et al., 2017; RASKO et al., 2011; RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009; SANTOS et al., 2017). Esses programas são regulamentados e implementados, no Brasil, através da Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), e da Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), e são necessários para a redução do risco de contaminação cruzada entre couros contaminados com conteúdo intestinal e carne bovina durante os procedimentos de abate (BOSILEVAC et al., 2005; BUNCIC et al., 2014). A redução significativa na detecção de STEC nas carcaças após evisceração e após lavagem final é um indicativo da correta execução das etapas de esfolagem e evisceração, mostrando que os programas de boas práticas estão adequadamente implementados.

Ainda, os abatedouros de bovinos devem fazer o controle microbiológico específico para STEC, determinada pela Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018), com o objetivo de reduzir a prevalência desses agentes patogênicos. A legislação estabelece um monitoramento através da coleta e análise de 325 g de retalho de desossa obtidas por um plano de amostragem. No caso de resultado positivo para STEC, o abatedouro frigorífico deve destinar o lote amostrado para tratamento pelo calor que comprovadamente seja eficaz na eliminação de STEC e realizar investigação para identificar a causa da contaminação, revisando seus programas de autocontrole, com ênfase nas boas práticas de abate.

A partir das comparações das frequências de isolamento de DEC entre os animais criados em sistemas diferentes, foi possível verificar uma influência do sistema extensivo no isolamento de STEC (Tabela 03). Poucos estudos comparam a ocorrência de STEC nos diferentes sistemas de criação de bovinos. Hornitzky et al. (2002) isolaram STEC em 48% das propriedades com sistemas de produção de gado de corte baseados em pastagens e, em apenas, 18% das propriedades com sistema de confinamento, tanto de gado de corte quanto de gado leiteiro. Diferentemente, Renter, Sargeant e Hungerford (2004) concluíram que a prevalência de STEC em amostras fecais obtidas de bovinos não foi associada ao ambiente de produção, uma vez que os bovinos confinados não apresentaram maior

probabilidade de detecção de *E. coli* O157:H7 do que os bovinos a pasto. Fegan et al. (2004), ao estudarem a prevalência e a concentração de *E. coli* O157 em fezes de bovinos de diferentes sistemas de produção coletadas durante abate, também concluíram que a detecção do patógeno não foi afetada pelos sistemas de produção avaliados (lotes de animais a pasto *versus* lotes de animais alimentados com uma dieta enriquecida com grãos por pelo menos 60 dias antes do abate).

Como *E. coli* coloniza o trato intestinal de bovinos, muitos estudos têm considerado a dieta e as práticas alimentares como fatores produtivos importantes que afetam o ecossistema microbiano, podendo influenciar na detecção de STEC nas fezes. DEC se multiplica no intestino de animais alimentados com dietas ricas em grãos, bem como naqueles alimentados com forragem, no entanto, os dados de detecção desse agente sob os efeitos da dieta podem ser conflitantes (BERARD et al., 2009; CALLAWAY et al., 2013b, 2009; CUEVA et al., 2010; MUNNS et al., 2015; SAPOUNTZIS et al., 2020; VAN BAALE et al., 2004).

O gado criado em sistema extensivo de produção é tipicamente alimentado com pastagens nativas ou cultivadas como única fonte de alimentos energéticos e proteicos, e alguns pesquisadores relataram que essas dietas podem contribuir para o aumento dos níveis de STEC nas fezes. Van Baale et al. (2004) observaram através de sua pesquisa que os bovinos alimentados com forragem apresentaram persistência ruminal e fecal de *E. coli* O157:H7 em concentrações quantificáveis por duas vezes mais que os bovinos alimentados com grãos. Anteriormente, Hovde et al. (1999) já haviam detectado *E. coli* O157:H7 por um período mais longo em fezes de bovinos consumindo dietas à base de forragem do que aqueles alimentados com dietas à base de grãos. Já outros estudos não conseguiram evidenciar uma diferença significativa na prevalência de STEC em bovinos alimentados em pastagens dos bovinos com uma dieta à base de alimentos concentrados (FEGAN et al., 2004; GRAUKE et al., 2003; RENTER; SARGEANT; HUNGERFORD, 2004). No entanto, de forma geral, uma maior quantidade de estudos evidenciam uma maior detecção de STEC em bovinos em confinamento alimentados com altas concentrações de grãos, além da frequente associação da presença de animais *super-shedding* à dieta baseada em grãos (BERARD et al., 2009; BERRY et al., 2006; CALLAWAY et al., 2013a, 2009; CUEVA et al., 2010; GILBERT et al., 2005; KRAUSE et al., 2003; MUNNS et al., 2015).

Contudo, esses trabalhos levam em consideração apenas a dieta do animal,

onde a maioria foi desenvolvido *in vitro* ou com inoculação experimental com um número amostral reduzido, não levando em consideração o sistema de criação como um todo. Ainda, a maioria desses estudos têm se concentrado na verificação da prevalência específica do sorotipo O157:H7. Sendo assim, somente a diferenciação em dieta a pasto e dieta baseada em grãos parece não ter sido o fator determinante para as frequências obtidas nesta pesquisa.

Um outro fator que parece influenciar na eliminação de STEC é a microbiota do trato gastrointestinal dos bovinos. As variações de cada sistema de produção animal, da mesma forma que pode influenciar na detecção de DEC, exercem influência direta na microbiota do trato intestinal dos bovinos que, por sua vez, pode modular a excreção e a detecção desses patógenos. No estudo desenvolvido por Shanks et al. (2011), pesquisando o perfil das comunidades microbianas fecais de bovinos divididos em seis diferentes rebanhos (localizados em quatro regiões e submetidos a três tipos de dieta distintas), foi possível sugerir que as práticas de manejo animal influenciam fortemente na ecologia microbiana fecal, evidenciando que mudanças no manejo podem alterar dramaticamente a estrutura da comunidade bacteriana. Ainda, esses autores concluíram que o manejo alimentar constitui um determinante do microbioma bovino, mais importante do que a localização geográfica de criação do rebanho.

Kim et al. (2014) estudaram a variação da microbiota fecal bovina de acordo com a dieta. Foram amostrados bovinos alimentados com uma dieta altamente concentrada, moderadamente concentrada e foragem, onde os pesquisadores conseguiram evidenciar que a estrutura da microbiota fecal em bovinos é amplamente afetada pela dieta, principalmente quando se compara as dietas à base de forragem e grãos. Estudos também têm evidenciado variações na composição microbiana fecais de bovinos *super-shedding* e não *super-shedding* (KIM et al., 2017; MIR et al., 2020; SALAHEEN et al., 2019; WANG et al., 2018; XU et al., 2014; ZAHEER et al., 2017). Esses dados apoiam a ideia de que a composição da microbiota pode desempenhar um papel crítico no estabelecimento e/ou na ecologia de STEC no trato intestinal de bovinos.

Esta pesquisa foi realizada durante os meses de maio a setembro, época que coincide com o período seco na região estudada. Devido à diminuição das chuvas, ao fotoperíodo ser mais curto e às temperaturas serem mais baixas, ocorre uma diminuição da disponibilidade e da qualidade nutricional das pastagens. Essa

combinação de menor oferta e menor qualidade da forragem resulta em perda de peso dos animais, fazendo com que seja rotineira a suplementação estratégica nesse período com sal mineral com ureia, sal proteinado ou ração de semiconfinamento, indicando ser comum a prática de mudanças no manejo alimentar no sistema extensivo de criação de gado decorrente da oferta de pastagem (BERRY et al., 2006; FEGAN et al., 2004; MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015).

Ainda, este estudo foi delineado para seleção aleatória de lotes e animais, diferenciando-os apenas de acordo com o regime de criação predominante, em dois estados distintos para reduzir os efeitos da diversidade no manejo no campo e efeitos pré-abate, possibilitando amostragem de animais de diversos pontos dos estados, independente da distância entre abatedouro e fazendas. Desse modo, foi possível obter poucas informações do manejo nas propriedades. No entanto, foi verificado junto aos produtores que os lotes provenientes do sistema extensivo receberam algum tipo de suplementação, sendo que em três lotes foi possível obter a confirmação que na fase final de engorda, para um melhor acabamento de carcaça, houve o fornecimento de dieta à base de grãos.

Sendo assim, as condições climáticas nos estados amostrados influenciando na composição e manejo das pastagens, as práticas alimentares e as mudanças de manejo nos períodos que antecedem o abate podem ter atuado tanto na frequência quanto na excreção de STEC, observando uma frequência maior em animais criados em sistema extensivo de produção por estarem mais expostos a essas alterações, quanto ter exercido efeito direto na microbiota contribuindo, desse modo, na modulação de agentes patogênicos, interferindo na passagem de STEC pelo trato gastrointestinal e na sua colonização, afetando assim sua prevalência e concentração nas fezes.

O levantamento da frequência de STEC em bovinos foi feito com coleta de amostra de fezes durante o abate, não sendo avaliada a presença do patógeno antes do manejo pré-abate. Os efeitos do jejum, transporte e espera durante esse período podem anular a influência que possam ter ocorrido na fazenda. O período pré-abate dos bovinos é considerado crítico para a disseminação de STEC uma vez que pode induzir um alto nível de estresse (ARTHUR et al., 2010; COSTA et al., 2012; POINTON; KIERMEIER; FEGAN, 2012), sobretudo em bovinos criados extensivamente que, por serem animais menos manejados ao longo da sua vida

produtiva, são mais suscetíveis ao estresse. Essa condição pode ocasionar uma imunossupressão induzida por estresse resultando na maior susceptibilidade à colonização e à multiplicação de STEC (CALLAWAY et al., 2013a; COSTA et al., 2012; CROSSLAND; CALLAWAY; TEDESCHI, 2015).

Ainda, o estresse animal resulta na liberação de norepinefrina no trato gastrointestinal de bovinos que já foi evidenciado por favorecer o crescimento de *E. coli* O157:H7 (BERRY; WELLS, 2010). Assim, a variação na frequência de STEC nos diferentes tipos de criação de bovinos pode ser influenciada não apenas pela diferença da alimentação baseada em grão ou em pastagem. Fatores como estresse, níveis hormonais e manejo pré-abate podem ter sido determinantes na detecção de uma frequência significativamente maior entre os animais provenientes do sistema extensivo de produção.

A maioria dos isolados STEC obtidos neste estudo apresentou gene *stx2*. A predominância de cepas portadoras de gene *stx2* é um risco à saúde pública. A toxina Shiga sintetizada por esse gene é a principal toxina envolvida nos casos mais graves da doença humana, fortemente associada à SHU (FULLER et al., 2011; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Além disso, neste estudo, foi confirmada a presença do gene *eae* em 8,8% dos isolados de STEC. Esse gene codifica a intimina, uma proteína responsável pela ligação íntima de STEC às células epiteliais intestinais, causando lesões de *attaching and effacing* na mucosa intestinal. Esse fator de virulência está presente na subcategoria de STEC amplamente conhecida como EHEC (CROXEN; FINLAY, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Todos os isolados que confirmaram o gene *eae* portavam o gene *stx2*, destacando o alto potencial de virulência dessas cepas.

Com relação aos demais patótipos de DEC obtidos nesta pesquisa, os sistemas de produção avaliados não determinaram diferenças nas suas frequências nas amostras analisadas (Tabela 3). Apesar deste estudo ter isolado EIEC em fezes de bovinos, esse patótipo não é frequentemente detectado em animais. Kagambèga et al. (2012), que pesquisaram a prevalência de DEC em fezes de bovinos, aves e suínos abatidos em Burquina Faso na África, encontraram EIEC apenas nas fezes de aves. O fato da frequência de EIEC ser considerada baixa entre os animais pode ser devido ao principal reservatório desse patógeno ser considerado o intestino de humanos infectados (MENG et al., 2013).

EPEC é considerado um dos agentes predominantes em diarreia humana, sendo o primeiro patotipo a ser identificado entre *E. coli* diarreiogênicas (CROXEN et al., 2013; GAYTÁN; MARTÍNEZ-SANTOS; SOTO, 2016). Esse patotipo é dividido em tEPEC, caracterizado pela presença de um plasmídeo de virulência denominado fator de adesão EPEC (pEAF) onde se localizam os genes envolvidos na montagem e expressão de uma adesina fimbrial responsável pela aderência interbacteriana e pela adesão às células epiteliais, e aEPEC, cepas sem esse plasmídeo (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; VIDAL; CANIZÁLEZ-ROMÁN, 2007).

Neste estudo, EPEC foi isolado na frequência de 2,0% entre os bovinos (tabela 03). Monaghan et al. (2013) e Bolton, Ennis e McDowell (2014), na Irlanda, e Júnior et al. (2017), no Brasil, relataram uma prevalência de 3,9% (47/1200), 5,8% (28/480), 2,5% (01/40), respectivamente, a partir de amostras de fezes de bovinos, semelhante ao percentual de EPEC encontrado nesta pesquisa. Em carcaça, apenas uma amostra foi positiva, sendo detectado EPEC no couro do animal amostrado (tabela 2). Stella et al. (2020), ao analisarem carcaças bovinas, encontraram uma frequência de 9,7% de EPEC. Os bovinos amostrados (n = 154) tinham procedências em diferentes fazendas da região sudoeste do estado de Goiás e todos provenientes do sistema extensivo de produção. Monaghan et al. (2013) analisaram 450 amostras de couro dos animais obtidas imediatamente antes da esfolagem e 450 amostras de carcaças bovinas obtidas antes do resfriamento, coletadas de animais provenientes de vinte fazendas e três abatedouros na Irlanda durante um período de doze meses, e também encontraram um percentual maior ao detectado nesta pesquisa, 6,4% de aEPEC no couro e 0,7% de aEPEC nas carcaças.

Todos os isolados obtidos nesta pesquisa foram classificados como aEPEC. Embora a associação epidemiológica desse grupo com diarreia ainda seja controversa, seu envolvimento com surtos diarreicos apoia o conceito de que algumas cepas de aEPEC podem induzir diarreia em humanos de todas as idades (VIEIRA et al., 2016). Ao contrário do tEPEC, que raramente é encontrado em animais, cepas de aEPEC foram encontradas em animais diarreicos e saudáveis. Alguns sorogrupos de aEPEC isolados de animais já foram identificados em quadros de diarreia humana, sugerindo assim o potencial zoonótico de algumas cepas (HERNANDES et al., 2009; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; MOURA et al., 2009).

Combinações de genes podem ser usadas para agrupar cepas de *E. coli* em grupos filogenéticos para melhor entender a epidemiologia e a distribuição da bactéria em diversos territórios. Entre os isolados de EPEC, EIEC e STEC, o filogrupo genético B1 foi o mais frequente (Figura 07). Badouei et al. (2016) também detectaram o grupo B1 como o mais predominante entre isolados de EHEC obtidos de bovinos. Coura et al. (2015) também indicaram que o grupo B1 é o principal filogrupo de *E. coli* isolado de bovinos. Taghadosi, Shakibaie e Hosseini-Nave (2019) encontraram 71,5% de EPEC isoladas de ruminantes pertencentes ao grupo B1. Embora as cepas comensais estejam relacionadas aos grupos A e B1, foi demonstrado que cepas patogênicas intestinais podem pertencer aos grupos A, B1 e D, sendo que o filogrupo B1 tem sido frequentemente associada a hospedeiros herbívoros. Outra característica importante é que a maioria das cepas de *E. coli* que conseguem sobreviver no ambiente, aparentemente, também pertencem a esse filogrupo (BALDY-CHUDZIK; MACKIEWICZ; STOSIK, 2008; CARLOS et al., 2010; WALK et al., 2007).

O filogrupo E, por sua vez, foi composto apenas por isolados STEC, dentre eles, todos os isolados STEC *eae+*. Escobar-Páramo et al. (2004) afirmaram que as cepas de EHEC estão concentradas principalmente no filogrupo E, onde o sorotipo O157:H7 é o membro mais conhecido nesse grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004), evidenciando assim o potencial de virulência dos isolados desse filogrupo.

## 7. CONCLUSÃO

*Escherichia coli* patogênica foi isolada em fezes e carcaças de bovinos em abatedouros frigoríficos, porém não foi detectada em amostras de cortes cárneos finais. Desse modo, este estudo fornece evidências adicionais de que os bovinos são fontes potenciais desses patógenos, principalmente do patotipo STEC. A não detecção de DEC nos cortes cárneos sugere que procedimentos adequados durante o abate e processamento da carne desempenham um papel importante no seu controle. Portanto, esses perigos devem ser gerenciados pela indústria para limitar a disseminação pelo ambiente industrial.

Os bovinos de ambos os sistemas de produção apresentaram DEC, porém foi possível verificar um maior isolamento de STEC no sistema extensivo. No entanto, como as amostras foram coletadas durante o abate dos animais, os efeitos do jejum, transporte, mistura de lotes e espera nos abatedouros frigoríficos podem ter anulado a influência que possam ter ocorrido no campo. Novos estudos de como os bovinos tornam-se portadores na fazenda podem fornecer informações que ajudem identificar os riscos relacionados à contaminação de carcaças durante o abate. Além disso, são necessários mais estudos para determinar os fatores que influenciam a prevalência de STEC em bovinos para auxiliar no desenvolvimento de estratégias em toda a cadeia para controlar o risco de exposição do produto final com cepas relevantes que podem ocasionar quadros clínicos de grande seriedade em humanos.

Os isolados obtidos nesta pesquisa, sobretudo os isolados de STEC, apresentaram importantes fatores de virulência, destacando o alto potencial de patogenicidade dessas cepas. Ainda, os dois grupos filogenéticos que predominaram entre os isolados, filogrupo B1 e E, são constantemente associados às cepas patogênicas intestinais com capacidade de sobrevivência no ambiente. Essas evidências reforçam a importância do controle e monitoramento de *E. coli* diarreiogênica no campo e em abatedouro frigorífico de bovinos, visando minimizar a contaminação de produtos finais com um patógeno de importância em saúde pública.



## REFERÊNCIAS

- ABIEC. Beef Report: Perfil da pecuária no Brasil. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**, 2020, p. 49.
- ABRI, R. et al. Surveillance for enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from animal source foods in Northwest Iran. **Indian Journal of Medical Research**, v. 150, n. 1, p. 87–91, 2019.
- ACOSTA, G. J. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and pathotype distribution in children from peruvian rural communities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 574–579, 2016.
- AHMAD, A.; NAGARAJA, T. G.; ZUREK, L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, n. 1, p. 74–81, 2007.
- AHMED, D. et al. Presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in biofilms formed in water containers in poor households coincides with epidemic seasons in Dhaka. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1223–1229, 2013.
- AHMED, M. O.; ABOUZEED, Y. M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: A survey of dairy cattle in Tripoli, Libya. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, n. 1, 2014.
- AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297–306, 2007.
- AIJUKA, M.; BUYS, E. M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. **Food Microbiology**, v. 82, p. 363–370, 2019.
- AMÉZQUITA-MONTES, Z. et al. Genetic relatedness among *Escherichia coli* pathotypes isolated from food products for human consumption in Cartagena, Colombia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 454–461, 2015.
- ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Pathophysiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n. 3, p. 306–312, 2010.
- ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48, n. 3, p. 199–204, 2011.
- ANDRADE, G. I. et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1783–1790, 2012.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de Antimicrobianos na Produção de Bovinos e Desenvolvimento de Resistência**. 1ª edição ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004, p. 55.

ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145–150, 2007.

ARTHUR, T. M. et al. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4847–4852, 2002.

ARTHUR, T. M. et al. Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 32–37, 2010.

ASLAN, S. et al. Detection and evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga-toxin genes *stx1*, *stx2* in cattle meat samples. **Clinical Laboratory**, v. 64, n. 11, p. 1829–1834, 2018.

ASSIS, D. C. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine meat and meat products over the last 15 years in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Meat Science**, v. 173, p. 108394, 2021.

AUGUSTIN, J. C. et al. Contribution of foods and poor food-handling practices to the burden of foodborne infectious diseases in France. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1644, 2020.

BADOUEI, M. A. et al. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 342–348, 2016.

BAI, J.; SHI, X.; NAGARAJA, T. G. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 1, p. 85–89, 2010.

BAI, X. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 31–38, 2015.

BAKO, E. et al. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated in organic waste products (cattle fecal matter, manure and, slurry) from Cattle's markets in Ouagadougou, Burkina Faso. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, 2017.

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

BALLEM, A. et al. Prevalence and serotypes of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle from Northern Portugal. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0244713, 2020.

BARKOCY-GALLAGHER, G. A. et al. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 1978–1986, 2003.

BARLOW, R. S.; GOBIUS, K. S.; DESMARCHELIER, P. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–5, 2006.

BARLOW, R. S.; MELLOR, G. E. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes in Australian beef cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1239–1245, 2010.

BASTOS, F. C. et al. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 89–97, 2006.

BERARD, N. C. et al. Potential to reduce *Escherichia coli* shedding in cattle feces by using sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) forage, tested in vitro and in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1074–1079, 2009.

BERGAMINI, A. M. M. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 553–556, 2007.

BERRY, E. D. et al. Influence of genotype and diet on steer performance, manure odor, and carriage of pathogenic and other fecal bacteria. II. Pathogenic and other fecal bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2523–2532, 2006.

BERRY, E. D.; WELLS, J. E. Chapter 4 - *Escherichia coli* O157:H7: Recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. In: TAYLOR, S. L. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**. Cambridge, MA, USA: Academic Press Inc., 2010, p. 67–117.

BERTIN, Y. et al. The gluconeogenesis pathway is involved in maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98367, 2014.

BEUTIN, L. et al. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2483–2488, 1993.

BIBBAL, D. et al. Prevalence of carriage of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1397–1405, 2015.

BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 645–651, 2004.

BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; ROMERO BARRIOS, P. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p. 1095–1100, 2011.

BOLTON, D. J. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 357–365, 2011.

BOLTON, D. J.; ENNIS, C.; MCDOWELL, D. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the North-East of Ireland. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 2, p. 149–156, 2014.

BOSILEVAC, J. M. et al. Development and evaluation of an on-line hide decontamination procedure for use in a commercial beef processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 265–272, 2005.

BOSILEVAC, J. M. et al. Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 440–449, 2007.

BOSILEVAC, J. M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 2103–2112, 2011.

BRASIL. **Portaria Nº 368, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos.** Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, 1997.

BRASIL. **Portaria Nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Instituir o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC a ser implantado, gradativamente nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal – SIF, de .** Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, 1998.

BRASIL. **NORMA INTERNA DIPOA-SDA nº 2, de 20 de agosto de 2013.**

Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos/escherichia-coli/norma-interna-dipoa-sda-no-2-de-20-de-agosto-de-2013.pdf/view>>. Acesso em: 31 out. 2020

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 60, de 20 de dezembro de 2018. Controle microbiológico em carcaça de suínos e em carcaça e carne de bovinos em abatedouros frigoríficos.** Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial na União, 2018.

BRICHTA-HARHAY, D. M. et al. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 : H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States : an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6289–6297, 2008.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Microbiology**, v. 142, n. 11, p. 3305–3315, 1996.

BRUSA, V. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 1–6, 2013.

BRUSA, V. et al. Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242317, 2020.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 790–801, 2013.

BUNCIC, S. et al. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 288–297, 2014.

CABRERA-SOSA, L.; OCHOA, T. J. *Escherichia coli* diarrhea. In: RYAN, E. T. et al. (Eds.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. Tenth Edit ed. London: Elsevier Inc., 2020. p. 481–485.

CALLAWAY, T. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology**, v. 3, n. 1, p. 39–69, 2013a.

CALLAWAY, T. et al. Current and near-market intervention strategies for reducing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) shedding in cattle. **Agriculture, food and analytical bacteriology**, v. 3, n. 3, p. 103, 2013b.

CALLAWAY, T. R. et al. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. **Current Issues in Molecular Biology**, n. 11, p. 67–80, 2009.

CANADA. **Prevention of *E. coli* (*Escherichia coli*) infection**. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/e-coli/prevention-e-coli.html>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

CANIZALEZ-ROMAN, A. et al. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 36–45, 2013.

CARLOS, C. et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 161, 2010.

CARTER, M. Q. et al. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. **Food Microbiology**, v. 57, p. 81–89, 2016.

CARVALHO, A. F. et al. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 881–886, 2012.

CASTRO, V. S. et al. Shiga-toxin Producing *Escherichia coli*: pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 6, p. 1269–1280, 2017.

CASTRO, V. S. et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Brazil: a systematic review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019a.

CASTRO, V. S. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *E. coli* non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1117–1123, 2019b.

CATRY, B. et al. Effect of antimicrobial consumption and production type on antibacterial resistance in the bovine respiratory and digestive tract. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146488, 2016.

CDC. **Shiga Toxin-producing *Escherichia Coli* | 2018 Case Definition**. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/shiga-toxin-producing-escherichia-coli/case-definition/2018/>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

CDC. ***E. coli* (*Escherichia coli*)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>>. Acesso em: 2 nov. 2020.

CERNICCHIARO, N. et al. Risk factors associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Ontario beef cow-calf operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 1–2, p. 106–115, 2009.

CERQUEIRA, A. M. F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n. 1–2, p. 111–121, 1999.

CEZAR, I. M. et al. Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate. In: **Embrapa Gado de Corte**. 1ª edição ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2005. p. 44.

CHAGNOT, C. et al. Colonisation of meat by *Escherichia coli* O157:H7: Investigating bacterial tropism with respect to the different types of skeletal muscles, subtypes of myofibres, and postmortem time. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1–2, p. 11–20, 2001.

CHASE-TOPPING, M. et al. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 904–912, 2008.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DUNIÈRE, L.; FORANO, E. Comment garantir la sécurité microbiologique de la viande bovine? **La Revue Scientifique Viandes & Produits Carnés**, p. 1–9, 2016.

CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 369–371, 1998.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012.

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

COBBOLD, R. N. et al. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 5, p. 1023–1027, 2008.

COSTA, M. J. R. P. et al. Strategies to promote farm animal welfare in Latin America and their effects on carcass and meat quality traits. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 221–226, 2012.

COURA, F. M. et al. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. **The ScientificWorld Journal**, v. 2015, p. 1–4, 2015.

CPT. **Manejo nutricional de gado de corte: Guia prático com tudo que você precisa saber para não perder dinheiro.** CPT cursos presenciais, 2020, p. 205.

CROSSLAND, W. L.; CALLAWAY, T. R.; TEDESCHI, L. O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: a match made in heaven? In: RICKE, S. C.; PHILLIPS, C. A.;

DONALDSON, J. R. (Eds.). **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems.** London: Elsevier Inc., 2015. p. 185–214.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

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

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, 2010.

DAVIES, S. Real farming solutions to antibiotic misuse: what farmers and supermarkets must do. **Alliance to Save our Antibiotics**, 2017, p. 28.

DENG, W. et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3597–3602, 2004.

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

DOUMITH, M. et al. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 3108–3110, 2012.

DUFFY, G.; BURGESS, C. M.; BOLTON, D. J. A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 375–383, 2014.

DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5810–5817, 2004.

DURSO, L. M.; SMITH, D.; HUTKINS, R. W. Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6466–6472, 2004.

ECDC. **Prevention and control measures for *Escherichia coli*.** Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/prevention-and-control>>. Acesso em: 13 dez. 2020.



EL-SEEDY, F. R. et al. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45–51, 2016.

ELDER, R. O. et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

ELLIOTT, S. J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v.28, n. 1, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115–6126, 2000.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

FAGAN, P. K. et al. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 868–72, 1999.

FALLAH, N. et al. Occurrence, pathotypes, and antimicrobial resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains in animal source food products from public markets in Mashhad, Iran. **Food Control**, v. 121, p. 107640, 2021.

FARAH, S. M. S. S. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 607–612, 2007.

FDA. **Food Code**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/fda-food-code/food-code-2017>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

FDA. ***Escherichia coli* (E. coli)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/escherichia-coli-e-coli>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

FEGAN, N. et al. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Journal of Applied Microbiology**, n. 97, n. 2, p. 362–370, 2004.

FENG, P. et al. **BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria | FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>>. Acesso em: 6 set. 2020.

- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. **Diarrheagenic *Escherichia coli***. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 4, p. 635–639, 2014.
- FERREIRA, M. R. A. et al. 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1807–1813, 2018.
- FLECKENSTEIN, J. M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p. 89-98, 2010.
- FLINT, H. J. et al. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health - Minireview. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1101–1111, 2007.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- FRAZÃO, N. et al. Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 36, p. 17906–17915, 2019.
- FREMAUX, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; VERNZOY-ROZAND, C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. **Veterinary Microbiology**, v.132, n. 1-2, p.1-18, 2008.
- FULLER, C. A. et al. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1329–1337, 2011.
- GAYTÁN, M. O.; MARTÍNEZ-SANTOS, V. I.; SOTO, E. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1–25, 2016.
- GIAOURIS, E. et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–26, 2015.
- GILBERT, R. A. et al. Effect of finishing diets on *Escherichia coli* populations and prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* virulence genes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 885–894, 2005.
- GIRARD, F. et al. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 6005–6016, 2005.

GOMES, T. A. T. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1851–1855, 2004.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.

GOULD, L. H. et al. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 5, p. 453–460, 2013.

GRAUKE, L. J. et al. Acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 from the gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 211–225, 2003.

GREGORY, N. G. et al. Effect of preslaughter feeding system on weight loss, gut bacteria, and the physico-chemical properties of digesta in cattle. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 43, n. 3, p. 351–361, 2000.

GUIGNOT, J. et al. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa / Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 204–221, 2007.

GUTEMA, F. D. et al. Occurrence, molecular characteristics, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 in cattle, beef, and humans in Bishoftu Town, Central Ethiopia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2021.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45–62, 2007.

HERNANDES, R. T. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 44, n. 11, p. 4214–4217, 2006.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, p. 137–149, 2009.

HORNITZKY, M. A. et al. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6439–6445, 2002.

HOVDE, C. J. et al. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 65, p. 3233–3235, 1999.

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

- IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 29–36, 2005.
- ISLAM, M. A. et al. Prevalence and genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5414–5421, 2008.
- ISLAM, M. A. et al. Occurrence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw meat, raw milk, and street vended juices in Bangladesh. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 11, p. 1381–1385, 2010.
- ISLAM, M. Z. et al. Regional variation in the prevalence of *E. coli* O157 in cattle: a meta-analysis and meta-regression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93299, 2014.
- ISO. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups, 13136:2012. **ISO**, 2012, p. 23.
- JARDIM, F. B. B. et al. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 277–282, 2006.
- JENSEN, B. H. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.
- JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750–774, 2009.
- JONES, T. H. et al. Numbers of coliforms, *Escherichia coli*, F-RNA phage, rotavirus, bovine enteric calicivirus and presence of non-O157 STEC on commercial vacuum packaged beef. **Food Microbiology**, v. 42, p. 225–231, 2014.
- JU, W. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington D.C. area. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 371–377, 2012.
- JÚNIOR, F. V. et al. Identification of virulence factors of *Escherichia coli* isolates from fecal samples of calves in southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, p. 1–6, 2017.
- JURE, M. A. et al. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 125–131, 2015.
- KAGAMBÈGA, A. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. **Microbiology Open**, v. 1, n. 3, p. 276–284, 2012.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; NÚÑEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 685–690, 2013.

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

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 360–370, 2010.

KIM, M. et al. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 2, p. 683–694, 2014.

KIM, M. et al. The impact of the bovine faecal microbiome on *Escherichia coli* O157 : H7 prevalence and enumeration in naturally infected cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 1027–1042, 2017.

KNUTTON, S. Cellular responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Bioscience Reports**, v. 15, n. 6, p. 469–479, 1995.

KNUTTON, S. et al. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 32–40, 2001.

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1–12, 2015.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, 2013.

KRAUSE, D. O. et al. Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 57–65, 2003.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 358, p. 3–32, 2013.

LEJEUNE, J. T.; WETZEL, A. N. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. **Journal of animal science**, v. 85, p. e73–e80, 2007.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1–2, p. 103–109, 2003.

LEOTTA, G. A. et al. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 46, 2008.

LEVINE, M. M. et al. Immunity to Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, p. 729-736, 1979.

LI, R. et al. Molecular screening and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail foods. **Food Control**, v. 60, p. 180–188, 2016.

LOIKO, M. R. et al. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. **Meat Science**, v. 116, p. 193–200, 2016.

LONERAGAN, G. H.; BRASHEARS, M. M. Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. **Meat Science**, v. 71, n. 1, p. 72-78, 2005.

LOPES, L. M. et al. heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1968–1972, 2005.

LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for cattle hides and beef carcasses. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 347-359, 2011.

LOTHIGIUS, Å. et al. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1441–1449, 2010.

LOWE, R. M. S. et al. Factors influencing the persistence of *Escherichia coli* O157:H7 lineages in feces from cattle fed grain versus grass hay diets. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 667–675, 2010.

MACITELLI, F.; BRAGA, J. DA S.; COSTA, M. J. R. P. **Boas Práticas de Manejo - Bovino de Corte**. JBS, 2020, p. 28.

MASANA, M. O. et al. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 12, p. 2008–2017, 2011.

MATHUSA, E. C. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9, p. 1721-1736, 2010.

MCADAM, A. J. **Diagnostic Testing for Enteric Pathogens**. Philadelphia: Elsevier, 2015.

MCALLISTER, T. A. et al. Nutrition, feeding and management of beef cattle in intensive and extensive production systems. In: BAZER, F.; LAMB, G. C.; WU, G. (Eds.) . **Animal Agriculture: sustainability, challenges and inovations**. 1ª edition, Academic Press, 2020. p. 75–98.

MEDEIROS, S. R.; GOMES, R. DA C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Embrapa, 2015, p. 162.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 1–13, 2014.

MENDONCA, A.; THOMAS-POPO, E.; GORDON, A. Chapter 5 - Microbiological considerations in food safety and quality systems implementation. In: GORDON, A. (Eds.). **Food Safety and Quality Systems in Developing Countries**. Academic Press, 2020, p. 185–260.

MENG, J. et al. Chapter 12 - Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. (Eds.). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 4th Edition. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2013. p. 287–309.

MIR, R. A. et al. Recto-anal junction ( RAJ ) and fecal microbiomes of cattle experimentally challenged with *Escherichia coli* O157 : H7. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–13, 2020.

MOHAMMED, M. A. M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 159–164, 2012.

MONAGHAN, A. et al. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 595–603, 2013.

MONAGHAN, Á. et al. Serotypes and virulotypes of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 223–229, 2012.

MORA, A. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. **BMC Microbiology**, v. 7, 2007.

MOURA, R. A. et al. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7399–7408, 2009.

MUNNS, K. D. et al. Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 2, p. 89–103, 2015.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, 1987.

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

NAVARRO, A. et al. Characterization of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* isolated from cattle raised in three regions of Mexico. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–9, 2018.

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

NIU, Y. D. et al. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 646–656, 2009.

NOBILI, G. et al. Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from raw beef in southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 201–205, 2017.

OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 64–75, 2014.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 139–146, 2008.

ORI, E. L. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. 1–9, 2019.

OSAILI, T. M.; ALABOUDI, A. R.; RAHAHLAH, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157: H7 on beef cattle slaughtered in Amman abattoir. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 463–468, 2013.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450–479, 1998.

PELAYO, J. S. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in bovine meat in the northern region of Parana state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1–11, 2019.

PERELLE, S. et al. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 284–288, 2007.

PERESI, J. T. M. et al. Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. **Food Control**, v. 63, p. 165–170, 2016.

PERNA, N. T. et al. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3810–3817, 1998.



PIGATTO, C. P. et al. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 588–593, 2008.

PIZARRO, M. A. et al. Virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E.coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1173–1180, 2013.

POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 313–321, 2012.

POLITO, M. G.; MASTROIANNI, G. Microangiopatias trombóticas : púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 3, p. 303–315, 2010.

POPPI, D. P. et al. Challenges of beef cattle production from tropical pastures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, p. 1–9, 2018.

PRATA, C. B. et al. Qualidade microbiológica da carcaça bovina durante o processo de abate e a ocorrência de *E. coli* O157: H7 na carne. **Ars veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 93–97, 2013.

PROCOP, G. W. et al. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7ª Edição ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

RAMANATHAN, R. et al. Consumer practices and risk factors that predispose to premature browning in cooked ground beef. **Meat and Muscle Biology**, v. 3, n. 1, p. 526–531, 2019.

RASKO, D. A. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic–uremic syndrome in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 709–717, 2011.

RENTER, D. G.; SARGEANT, J. M.; HUNGERFORD, L. L. Distribution of *Escherichia coli* O157 : H7 within and among cattle operations in pasture-based agricultural areas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 10, p. 1367–1376, 2004.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 357–376, 2009.

RIGOBELLO, E. C. et al. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 194–198, 2006.

RIGOBELLO, E. C.; ÁVILA, F. A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from Beef Carcass. **Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 4, p. 103–107, 2012.

- RIGOBELLO, E. C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Beef carcass contamination by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in an abattoir in Brazil: Characterization and resistance to antimicrobial drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 6, p. 811–817, 2008.
- RISTORI, C. A. et al. Assessment of consumer exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products at retail in the city of São Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 8, p. 447–453, 2017.
- RIVAS-RUIZ, C. M. et al. Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México. **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, v. 7, n. 2, p. 1–7, 2020.
- RIVERA, F. P. et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1166–1169, 2012.
- RODOLPHO, D.; MARIN, J. M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 599–602, 2007.
- RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680–2686, 1996.
- RØSSVOLL, E. et al. Consumer preferences, internal color and reduction of shigatoxigenic *Escherichia coli* in cooked hamburgers. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 695–703, 2014.
- SALAHEEN, S. et al. Metagenomic analysis of the fecal microbiomes from *Escherichia coli* O157 : H7-shedding and non-shedding cows on a single dairy farm. **Food Control**, v. 102, p. 76–80, 2019.
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE. **Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2016**. Disponível em: <[http://www.santepubliquefrance.fr/media/files/01-maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/tiac\\_donnees\\_2016](http://www.santepubliquefrance.fr/media/files/01-maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/tiac_donnees_2016)>. Acesso em: 12 dez. 2020.
- SANTOS, E. C. C. et al. *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on carcasses and beef from a slaughterhouse located in Mato Grosso, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 10, p. 653–659, 2018.
- SANTOS, E. C. C. et al. Evaluation of the sanitary conditions of head meat, esophagus, diaphragm meat, and boning scrap processing. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 1–4, 2017.

SAPOUNTZIS, P. et al. An overview of the elusive passenger in the gastrointestinal tract of cattle: the Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 877, 2020.

SARGEANT, J. M. et al. Associations between management, climate, and *Escherichia coli* O157 in the faeces of feedlot cattle in the Midwestern USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 66, p. 175–206, 2004.

SARGEANT, J. M. et al. Pre-harvest interventions to reduce the shedding of *E. coli* O157 in the faeces of weaned domestic ruminants: A systematic review. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, n. 6-7, p. 260-277, 2007.

SARIDAKIS, H. O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 145–153, 1997.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.

SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951–2963, 2012.

SCHOKKER, D. et al. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SCOTT, L. et al. The characterisation of *E. coli* O157:H7 isolates from cattle faeces and feedlot environment using PFGE. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3–4, p. 331–336, 2006.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa / Dr adhesins (Afa / Dr DAEC ): current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 823–869, 2014.

SHANKS, O. C. et al. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2992–3001, 2011.

SMITH, B. A.; FAZIL, A.; LAMMERDING, A. M. A risk assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and beef cuts in Canada: evaluating the effects of interventions. **Food Control**, v. 29, n. 2, p. 364–381, 2013.

SOUZA, R. L. DE. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, n. 1, p. 76–82, 2011.

SPENCER, S. E. F. et al. “Super” or just “above average”? Supershedders and the transmission of *Escherichia coli* O157:H7 among feedlot cattle. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 110, 2015.

SPERANDIO, V. SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 in the bovine rumen. **Gut Microbes**, v. 1, n. 6, p. 432–435, 2010.

STANFORD, K. et al. Variable efficacy of a vaccine and direct-fed microbial for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 5, p. 379–387, 2014.

STELLA, A. E. et al. Frequency of antibiotic resistant enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in bovine carcasses at a slaughterhouse in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e475974339, 2020.

STEVENS, M. P. et al. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, v. 148, n. 12, p. 3767–3778, 2002.

STEVENS, M. P.; FRANKEL, G. M. The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, 2014.

STROMBERG, Z. R. et al. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 on hides and preintervention carcass surfaces of feedlot cattle at harvest. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 7, p. 631–638, 2015.

SVOBODA, A. L. et al. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O-groups in small and very-small beef-processing plants and resulting ground beef detected by a multiplex polymerase chain reaction assay. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 9, p. 789–795, 2013.

TAGHADOSI, R.; SHAKIBAIE, M. R.; HOSSEINI-NAVE, H. Antibiotic resistance, ESBL genes, integrons, phylogenetic groups and MLVA profiles of *Escherichia coli* pathotypes isolated from patients with diarrhea and farm animals in south-east of Iran. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 117–126, 2019.

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

TAHAMTAN, Y.; HAYATI, M.; NAMAVARI, M. Prevalence and distribution of the Stx, stx genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. **Iranian Journal Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 8–13, 2010.

TANARO, J. D. et al. Non-O157: H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine rectums and surface water streams on a beef cattle farm in Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 10, p. 878–884, 2012.

TANIMOTO, Y. et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers suppress cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 87, n. 1, p. 1–13, 2019.

TAYLOR, J. D. et al. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures? **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 12, p. 1351–1359, 2010.

TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 419–425, 2007.

TKALCIC, S. et al. Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1630–1636, 2000.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.

TORO, M. et al. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. **Food Microbiology**, v. 75, p. 55–60, 2018.

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

TRISTÃO, L. C. S. et al. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2–4, p. 358–365, 2007.

TSENG, M. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. **Animal Health Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 63-75, 2014.

UBER, A. P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 251–257, 2006.

USDA-FSIS. **Pre-Harvest Management Controls and Intervention Options for Reducing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding in Cattle: An Overview of Current Research**. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d5314cc7-1ef7-4586-bca2-f2ed86d9532f/Reducing-Ecoli-Shedding-in-Cattle.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 31 out. 2020.

USDA ERS. **Kidney damage responsible for 65 percent of illness costs from STEC O157**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=78625>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8799–8806, 2000.

- VAN BAALE, M. J. et al. effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5336–5342, 2004.
- VARCASIA, B. et al. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh beef marketed in 13 regions of Italy (2017). **Microorganisms**, v. 6, n. 4, p. 126, 2018.
- VÁSQUEZ-GARCÍA, A. et al. *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. **Aquaculture**, v. 504, p. 158–163, 2019.
- VAZ, T. M. I. et al. Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 798–804, 2006.
- VENEGAS-VARGAS, C. et al. Factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 16, p. 5049–5056, 2016.
- VIDAL, J. E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud pública de México**, v. 49, n. 5, p. 376–386, 2007.
- VIEIRA, M. A. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiological agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 998–1006, 2016.
- WALK, S. T. et al. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2274–2288, 2007.
- WALL, B. . et al. **Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial resistance in Animal Production**. 1ª edição ed. Roma: FAO, 2016.
- WANG, L. et al. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka city, Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1232–1240, 2013.
- WANG, L. et al. Use of bacteriophages to control *Escherichia coli* O157:H7 in domestic ruminants, meat products, and fruits and vegetables. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 9, p. 483–493, 2017.
- WANG, O. et al. Interactions of the hindgut mucosa-associated microbiome with its host regulate shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 by cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 1–15, 2018.
- WASILENKO, J. L. et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and *Salmonella* in retail raw

ground beef using the DuPont™ BAX ® system. **Frontiers Cellular Infection Microbiology**, v. 4, p. 1-7, 2014.

WHEELER, T. L.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J. M. Pre- and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the U.S. beef industry. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 372–382, 2014.

WHO. **E. coli**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

WIECZOREK, K.; BEUTIN, L.; OSEK, J. Rare VTEC serotypes of potential zoonotic risk isolated from bovine hides and carcasses. **Veterinary Record**, v. 168, n. 3, 2011.

XIA, X. et al. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 76, n. 6, p. 1709–1717, 2010.

XU, Y. et al. *Escherichia coli* O157:H7 super-shedder and non-shedder feedlot steers harbour distinct fecal bacterial communities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98115, 2014.

YERUSHALMI, G. et al. Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 15, p. 2798–2806, 2014.

YU, F. et al. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 7–13, 2018.

ZAHEER, R. et al. Changes in bacterial community composition of *Escherichia coli* O157 : H7 super-shedder cattle occur in the lower intestine. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017.

ZHU, Y. G. et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3435–3440, 2013.

**ANEXO A – Primers, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado de PCR usados para caracterizar isolados diarreio gênicos de *E. coli* obtidos em diferentes locais da cadeia produtiva de carne bovina.**

PCR	Gene Alvo	Função	Primers	Tamanho produto (pb)	Anelamento*	Referência	
1	simplex	<i>Stx</i>	Triagem VT com-u: VT com-d:	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518	52	Toma et al., 2003
2	simplex	<i>uspA</i>	Confirmação de espécie uspA F: uspA R:	CCGATACGCTGCCAATCAGT ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	884	68	Chen; Griffiths, 1998
3	multiplex	<i>Eae</i>	Confirmação de EPEC SK1: SK2:	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881	52	Toma et al., 2003
		<i>Stx</i>	Confirmação de STEC VT com-u: VT com-d:	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518		
		<i>ipaH</i>	Confirmação de EIEC ipaIII: ipaIV:	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	619		
		<i>aggR</i>	Confirmação de EAEC aggRks1: aggRks2:	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254		
4	simplex	<i>eElt</i>	Confirmação de ETEC LT <sub>L</sub> : LT <sub>R</sub> :	TCTCTATGTGCATACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	450	48	Toma et al., 2003
5	simplex	<i>Est</i>	Confirmação de ETEC AL65: AL125:	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CCTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC	190	48	Toma et al., 2003
6	simplex	<i>Bfp</i>	Caracterização de EPEC bfp-F: bfp-R:	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	52	Aranda et al., 2007
7	simplex	<i>stx1</i>	Caracterização de STEC stx1-F: stx1-R:	TGTCGCATAGTGGAACTCA TGCGCACTGAGAAGAAGAGA	655	63	Bai; Shi; Nagaraja, 2010
8	simplex	<i>stx2</i>	Caracterização de STEC stx2-F: stx2-R:	CCATGACAACGGACAGCAGTT TGTCGCCAGTTATCTGACATTC	477	63	Bai; Shi; Nagaraja, 2010; Fagan et al., 1999
9	simplex	<i>Eae</i>	Caracterização de STEC SK1: SK2:	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881	52	Toma et al., 2003
10	multiplex	<i>arpa</i>	Caracterização de Filogrupo AceK.F: ArpA1.R:	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCATACCGTACGCTA	400	65-61	Clermont et al., 2013; Doumith et al., 2012
		<i>chuA</i>	Caracterização de Filogrupo chuA-F: chuA-R:	ATGATCATCGCGCGTGCTG AAACGCGCTCGCGCTAAT	281		
		<i>yjaA</i>	Caracterização de Filogrupo yjaA-F: yjaA-R:	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	216		
		<i>TspE4.C2</i>	Caracterização de Filogrupo TSPE4.C2-F: TSPE4.C2-R:	GCGGGTGAGACAGAAACGCG TTGTCGTGAGTTGCGAACC	152		
11	simplex	<i>Arpa</i>	Filogrupo E ArpAgpE.F: ArpAgpE.R:	GATTCCATCTTGTCAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	57	Clermont et al., 2013
12	simplex	<i>trpA</i>	Filogrupo C trpAgpC.1: traAgpC.2:	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCAAGCCC	219	59	Clermont et al., 2013

\*Condições de PCR: **reação 1:** 16 µL, 95 °C for 7 min, 30 ciclos a 95 °C por 20 s, 52 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 2:** 20 µL, 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 68 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 3:** 16 µL, 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 20 s, 52 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 4 e 5:** 20 µL, 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 20 s, 48 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 6:** 16 µL, 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 20 s, 52 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 7 e 8:** 16 µL, 94 °C por 5 min, 25 ciclos a 94 °C por 20 s, 63 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 9:** 16 µL, 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 20 s, 52 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 7 min; **reação 10 (touchdown PCR):** 20 µL, 94 °C por 4 min, 10 ciclos a 94 °C por 30 s, 65-61 °C por 30 s (a cada ciclo diminui 0.5 graus), 72 °C por 30 s, 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 5 min; **reação 11:** 20 µL, 94 °C por 4 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 57 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 5 min; **reação 12:** 20 µL, 94 °C por 4 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 59 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 5 min.



ANEXO B - Árvore decisória proposta para classificação dos filogrupos genéticos de *E. coli* por Clermont et al. (2013).

