

***Escherichia coli* patogénica, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em dois Centros de Conservação da Vida Selvagem em Portugal: caracterização genotípica e fenotípica**

Pathogenic Escherichia coli, Salmonella spp. and Campylobacter spp. in two Natural Conservation Centers of Wildlife in Portugal: genotypic and phenotypic characterization

Ângela Pista ¹, Leonor Silveira ¹, Sofia Ribeiro ¹, Mariana Fontes ¹, Rita Castro ¹, Anabela Coelho ², Rosália Furtado ², Teresa Lopes ³, Carla Maia ², Verónica Mixão ⁴, Vítor Borges ⁴, Ana Sá ⁵, Vanessa Soeiro ⁶, Cristina Belo Correia ², João Paulo Gomes ^{4,7}, Margarida Saraiva ³, Mónica Oleastro ¹, Rita Batista ²

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Laboratório de Microbiologia. Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Laboratório de Microbiologia. Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(4) Unidade de Investigação do Núcleo de Genómica e Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(5) Tapada Nacional de Mafra, Mafra, Portugal

(6) Centro de Recuperação de Fauna do Parque Biológico de Gaia, Vila Nova de Gaia, Portugal

(7) Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal

(8) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A coexistência entre humanos e animais selvagens pode aumentar o risco de transmissão direta de agentes patogénicos zoonóticos emergentes ou reemergentes para humanos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de três importantes agentes patogénicos de origem alimentar em animais selvagens de dois centros de conservação da vida selvagem, em Portugal. Para tal, foram testadas 132 amostras fecais para a presença de *Escherichia coli* (*E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e não produtora de toxina Shiga (não-STEC)), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.. Foi realizada a caracterização genotípica (pesquisa de genes de virulência, pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos (AMR), sequenciação total do genoma (WGS)) e fenotípica (serotipagem e perfis de AMR) de todos os isolados de interesse.

No geral, 62 amostras testaram positivo para pelo menos uma das espécies analisadas: 27,3% para STEC, 11,4% para não-STEC, 3,0% para *Salmonella* spp. e 6,8% para *Campylobacter* spp. Foi detetada resistência a antimicrobianos em quatro isolados de *E. coli* e no único isolado de *Campylobacter coli*. A análise de WGS revelou que 57,7% (30/52) das *E. coli* patogénicas integram agrupamentos genéticos de isolados fortemente relacionados (muitas vezes envolvendo diferentes espécies de animais), indicando a existência de circulação e transmissão de diferentes estirpes patogénicas de *E. coli* nas áreas estudadas.

Estes resultados apoiam a ideia de que a saúde dos seres humanos, dos animais e dos ecossistemas são interdependentes, reforçando a importância de uma abordagem *One Health* (Uma Só Saúde) para melhor monitorizar e controlar as ameaças em saúde pública.

_Abstract

Human-wildlife coexistence may increase the potential risk of direct transmission of emergent or re-emergent zoonotic pathogens to humans. Intending to assess the occurrence of three important foodborne patho-

gens in wild animals of two wildlife conservation centers in Portugal. We investigated 132 fecal samples for the presence of pathogenic *E. coli* (Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and non-STEC), *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp.. Genotypic characterization (search for virulence and antimicrobial resistance (AMR) genes, Whole-Genome Sequencing (WGS)), as well as phenotypic characterization (serotyping and AMR profiles) of all isolates of interest were performed.

Overall, 62 samples tested positive for at least one of these species: 27.3% for STEC, 11.4% for non-STEC, 3.0% for *Salmonella* spp. and 6.8% for *Campylobacter* spp. AMR was detected in four *E. coli* isolates and in the only *Campylobacter coli* isolated in this study. WGS analysis revealed that 57.7% (30/52) of pathogenic *E. coli* integrated genetic clusters of highly closely related isolates (often involving different animal species), supporting the circulation and transmission of different pathogenic *E. coli* strains in the studied areas.

These results support the idea that the health of humans, animals and ecosystems are interconnected, reinforcing the importance of a *One Health* approach to better monitor and control public health threats.

_Introdução

A interface entre vida selvagem, animais que se destinam à produção alimentar e seres humanos, representa um ponto crítico de interação entre espécies e consequente transmissão e emergência/reemergência de agentes patogénicos em novas populações hospedeiras (1). De facto, das mais de 1400 espécies de agentes patogénicos que afetam o ser humano, mais de metade são de origem zoonótica. Estes agentes patogénicos podem ter uma ampla gama de hospedeiros.

deiros, sendo por isso, uma tarefa complexa avaliar as associadas potenciais perdas económicas diretas e indiretas, em setores como a saúde pública, saúde animal e meio ambiente (2-4). Como tal, é crucial a implementação de programas integrativos de vigilância da vida selvagem, seguindo uma abordagem *One Health* (Uma Só Saúde), de forma a melhor compreendermos a interconetividade dos diferentes agentes patogénicos presentes em amostras clínicas humanas, nos animais e no ambiente e, conseqüentemente, melhor detetarmos e controlarmos as ameaças em saúde pública (5,6).

Os javalis (*Sus scrofa*) são uma espécie com uma distribuição geográfica mundial e com um aumento significativo na Europa nas últimas décadas (7). Em Portugal, javalis e espécies de cervídeos (veado vermelho- *Cervus elaphus* e gamo- *Cervus dama*) são encontrados, principalmente, em áreas limitadas e controladas. Estas espécies são consideradas potenciais vetores na transmissão de agentes patogénicos para os seres humanos, quer por contacto direto, por exemplo, no contexto de atividades de caça, quer por contaminação indireta de alimentos, águas ou áreas ambientais frequentadas por pessoas ou animais de estimação, através da urina ou fezes.

Embora já existam alguns estudos na Europa, no contexto da *One Health*, acerca do potencial papel dos animais selvagens como reservatórios de presumíveis zoonoses, estes são escassos e normalmente focados num só agente patogénico (8-19).

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de três importantes agentes patogénicos de origem alimentar, *E. coli* patogénica, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em animais selvagens (javalis, veados vermelhos, gamos, ouriços (*Erinaceus europaeus*) e ginetas (*Genetta genetta*)) de duas populações e habitats diferentes, e caracterizar os serotipos, os marcadores de virulência, os perfis de resistência a antimicrobianos (AMR) e a diversidade genética dos isolados obtidos. Como os animais selvagens podem atuar como reservatórios eficientes de AMR, foi realizada a deter-

minação do perfil de AMR de uma fração das estirpes de *E. coli* não patogénicas. Foi também realizada uma análise de clusters dos isolados patogénicos de *E. coli*.

_Materiais e métodos

Populações estudadas e colheita de amostras

Este trabalho abrangeu duas áreas geográficas distintas, uma no distrito de Lisboa (Tapada Nacional de Mafra) e outra no norte de Portugal (Parque Biológico de Gaia). Foram colhidas 132 amostras individuais de fezes frescas de animais em liberdade entre julho de 2020 e junho de 2021. As amostras foram colhidas com material próprio esterilizado, mantidas refrigeradas e processadas de imediato após entrada no laboratório.

Métodos de isolamento e de caracterização fenotípica e genotípica

As estirpes foram isoladas recorrendo a métodos de isolamento convencionais. Para o caso de *E. coli* o isolamento foi efetuado como descrito em Pista *et al.* (20), para *Salmonella* spp., em conformidade com a ISO 6579-1:2017 (21), e para *Campylobacter* spp. em conformidade com a ISO 10272-1:2017 (22). A serotipagem de *Salmonella* spp. foi efetuada de acordo com o esquema de Kauffmann-White-Le Minor (23) por aglutinação dos antigénios O e H. Os perfis de resistência a antibióticos foram determinados por difusão em disco, seguindo as recomendações e os limites da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (24). A identificação de genes específicos associados à virulência e à resistência a antimicrobianos foi efetuada por PCR *multiplex* e/ou por sequenciação total do genoma (WGS). A análise de clusters (*core genome - Multilocus Sequence Typing*- cgMLST) dos 52 isolados patogénicos de *E. coli* foi realizada com base nos resultados de WGS utilizando a ferramenta ReporTree v1.0.0 (25) através do método MSTreeV2 do programa GrapeTree (26).

Resultados

Deteção e caracterização dos isolados

Na **tabela 1** estão compilados os resultados obtidos.

Sessenta e duas (62) das 132 amostras testadas (47,0%) apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das

espécies bacterianas patogénicas analisadas. Estirpes patogénicas de *E. coli* (STEC e não-STECC), de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp. foram detetadas em 37,9% (50/132), 3,0% (4/132) e 6,8% (8/118) das amostras, respetivamente (**tabela 1**).

Tabela 1: STEC, não-STECC, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nas 132 amostras testadas.

		TNM			CRFPBG		Total
		Javali	Gamo	Veado vermelho	Ouriço	Gineta	
Amostras testadas para <i>E. coli</i>		51	50	12	18	1	132
Isolados de <i>E. coli</i>	STEC No. (% amostras +)	3 (5,9)	29 (56,0*)	5 (41,7)	0	0	37 (27,3 ^a)
	EPEC No. (% amostras +)	3 (5,9)	7 (14,0)	1 (8,3)	1 (5,6)	0	12 (9,1)
	EETEC No. (% amostras +)	3 (5,9)	0	0	0	0	3 (2,3)
	Total No. (% amostras +)	9 (17,6)	36 (68,0*)	6 (50,0)	1 (5,5)	0	52 (37,9 ^a)
Amostras testadas para <i>Salmonella</i> spp.		51	50	12	18	1	132
Isolados de <i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i> No. (% amostras +)	1 (2,0)	0	0	0	0	1 (0,8)
	<i>S. Schleissheim</i> No. (% amostras +)	1 (2,0)	0	1 (8,3)	0	0	2 (1,5)
	<i>S. Veneziana</i> No. (% amostras +)	0	0	0	1 (5,6)	0	1 (0,8)
	Total No. (% amostras +)	2 (3,9)	0	1 (8,3)	1 (5,6)	0	4 (3,0)
Amostras testadas para <i>Campylobacter</i> spp.		39	50	12	16	1	118 ^b
Isolados de <i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. hyointestinalis</i> No. (% amostras +)	7 (17,9)	0	0	0	0	7 (5,9)
	<i>C. coli</i> No. (% amostras +)	0	0	0	0	1 (100)	1 (0,8)
	Total No. (% amostras +)	7 (17,9)	0	0	0	1 (100)	8 (6,8)

TNM: Tapada Nacional de Mafra; CRFPBG: Centro de Recuperação de Fauna do Parque Biológico de Gaia; STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; EPEC: *E. coli* enteropatogénica; EETEC: *E. coli* enterotoxigénica; ExPEC: *E. coli* Extraintestinal; No.: Número; + : Positivas. ^a Foram detetadas diferentes estirpes patogénicas de *E. coli* numa mesma amostra de fezes de um gamo, um isolado identificado como EPEC e outro como STECC, e dois isolados STECC foram detetados noutra amostra de fezes de gamo; ^b Em 14 amostras não foi conseguido material suficiente para a deteção de *Campylobacter* spp.

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos e genotipagem dos isolados

Relativamente ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados de *Salmonella* spp. foram fenotipicamente suscetíveis aos 17 antimicrobianos testados e o isolado de *Campylobacter coli* apresentou resistência à Ciprofloxacina, Tetraciclina e Ampicilina. No caso das estirpes de *E. coli*, a resistência a antimicrobianos foi detetada fenotipicamente em 4,7% dos isolados testados (4/85; em 5,8% dos isolados patogénicos e 3,0% dos não patogénicos), dos quais um foi classi-

ficado como resistente a múltiplos antimicrobianos (MDR). Um isolado de *E. coli* enterotoxigénica (EETEC) de uma amostra de fezes de javali apresentou resistência à Tetraciclina e ao Sulfametoxazol; um isolado de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) de uma amostra de fezes de veado vermelho era resistente à Ampicilina, à Ciprofloxacina e ao Ácido Nalidíxico; um isolado EPEC de uma amostra de fezes de javali apresentou resistência à Ampicilina, Cloranfenicol e ao Sulfametoxazol (MDR) e um isolado não patogénico de *E. coli* da amostra de fezes da gineta era resistente ao Sulfametoxazol.

artigos breves_ n. 5

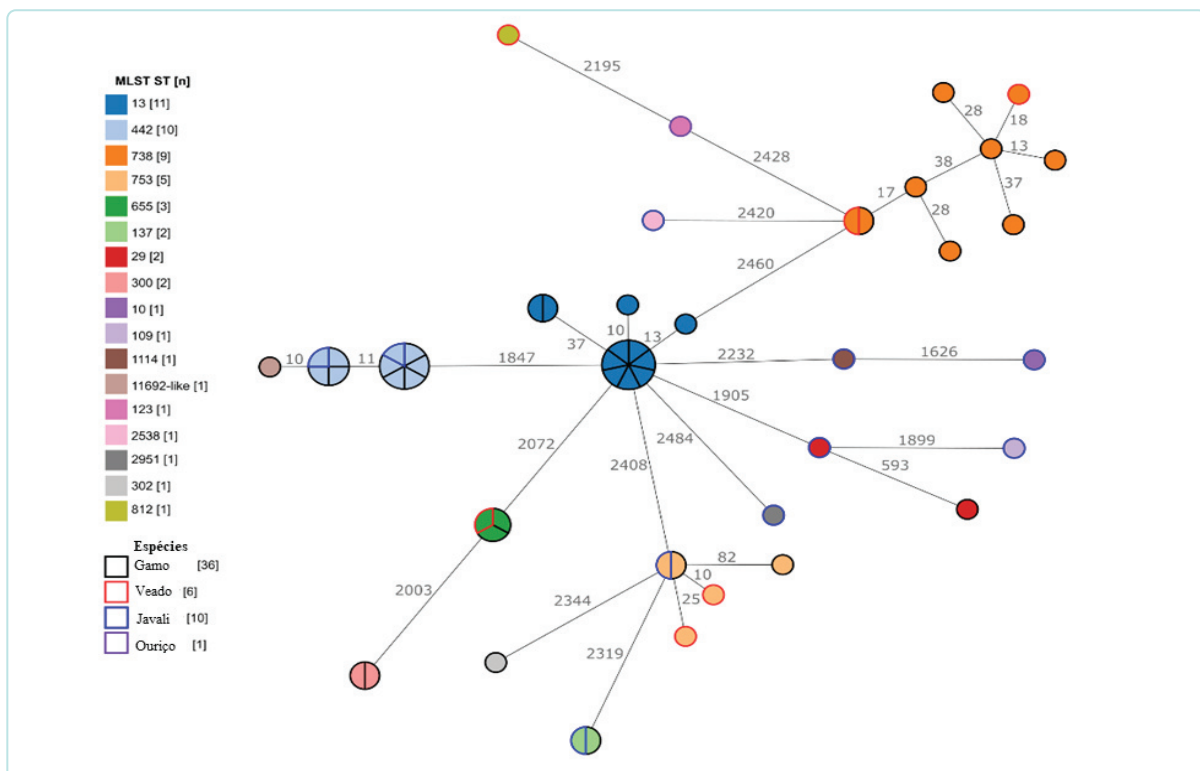
Quanto à genotipagem, os isolados de *S. Schleissheim* pertenciam aos ST53 (*Sequence Type* 53) e o de *S. Enteritidis* ao ST11. O isolado de *C. coli* foi identificado como pertencente ao ST1595. Entre os 52 isolados patogénicos de *E. coli*, foram identificados *in silico* 15 antígenos de tipo O e 10 de tipo H. Os serotipos mais prevalentes foram o O146:H21 e o O75:H8 (10 isolados de STEC cada), seguidos pelos serotipos O146:H28 (8 isolados de STEC) e O27:H30 (5 isolados de STEC). A tipagem de sequências multilocus (*Multilocus sequence Typing* – MLST) das estirpes patogénicas de *E. coli* identificou 16 STs, sendo o ST13 o mais comum (11 isolados), seguido pelo ST442 (10 isolados), ST738 (8 isolados) e ST753 (5 isolados).

Análise de clusters dos isolados patogénicos de *E. coli* (Core genome - *Multilocus Sequence Typing*- cgMLST)

Um passo fundamental na vigilância *One Health* é a avaliação da diversidade genética dos agentes patogénicos circu-

lantes, incluindo a identificação de estirpes que circulam entre diferentes espécies hospedeiras e/ou durante longos períodos de tempo. Para avaliar a proximidade genética dos 52 isolados patogénicos de *E. coli* foi realizada uma análise de cgMLST (figura 1). Foi considerado um *threshold* de 9 diferenças alélicas, abaixo do qual as estirpes foram consideradas potencialmente relacionadas a um nível semelhante àquele usado para deteção de surtos. Apesar de um número pequeno de amostras, verificou-se que 57,7% (30/52) dos isolados integraram *clusters*, num total de 9 (2 a 7 isolados por *cluster*). Seis dos nove *clusters* incluíam estirpes isoladas de diferentes espécies, no entanto, o maior *cluster* continha apenas isolados de amostras de fezes de gamo. De referir, que os dois isolados ST137 (figura 1) que formaram um *cluster*, apresentaram um perfil de resistência a antimicrobianos diferente (Suscetível vs. MDR).

Figura 1: Análise de clusters dos isolados patogénicos de *E. coli* (Core genome *Multilocus Sequence Typing* - cgMLST).



Cada círculo representa um isolado, ou um *cluster* de isolados com proximidade genética inferior ou igual a 9 diferenças alélicas. Cada divisão nos círculos respeitantes a *clusters* corresponde a um isolado. A cor interior dos círculos diz respeito aos *Sequence Types* (ST) e a cor do contorno dos mesmos corresponde à espécie animal de onde foi isolada a estirpe. As linhas ligam círculos com diferenças alélicas superiores a 9, com os números representando as diferenças alélicas encontradas.

_Discussão

A frequência de ocorrência de estirpes patogénicas de *E. coli* em amostras fecais de ungulados selvagens na Europa é extremamente variável. O valor de frequência encontrado neste estudo está de acordo com o relatado noutros estudos realizados recentemente em Itália (9) e na Polónia (15), mas é superior aos reportados em estudos realizados em Espanha (10) e Portugal (14). Esta heterogeneidade pode estar relacionada com diversos fatores, nomeadamente a proximidade de áreas urbanas, o número de animais por hectare ou a época do ano em que foi realizada a colheita da amostra. No que diz respeito aos resultados de frequência obtidos para *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. e à sua comparação com os obtidos em outros estudos europeus focados em amostras de fezes de ungulados, verifica-se também uma elevada heterogeneidade. No que diz respeito a *Salmonella* spp., são diversos os estudos que reportam a ausência deste agente patogénico nas amostras analisadas (17,27,28). No entanto, outros trabalhos reportam valores de frequência entre 1,1 e 10,8%, e há pelo menos um estudo que relata um valor superior em javalis (17,5%) (11,16,29-32), particularmente em populações que partilham o *habitat* com gado, onde a frequência aumenta para 35,7% (33). No caso de *Campylobacter* spp., existem vários estudos que reportam valores de frequência abaixo de 5% (16,27,28,34). No entanto, existe pelo menos um estudo, em Espanha, que referiu uma frequência de 15,2% em espécies selvagens da ordem *Artiodactyla* (35) e outro, realizado em Itália, que relatou um valor de frequência de 91,66% de *C. coli* em fezes de javalis em liberdade (18).

Na medida em que a resistência a antimicrobianos é uma ameaça mundial à saúde humana (36), foi realizado, neste trabalho, o perfil de resistência a antimicrobianos de todos os isolados patogénicos, bem como de uma parte dos isolados de *E. coli* comensais. De acordo com o relatório conjunto da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e do Centro Europeu de Controlo e Prevenção das Doenças (ECDC), de 2018/2019 - *European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic bacteria and indicator bacteria from humans, regarding animals and food* (37), todas

as resistências antimicrobianas identificadas neste estudo já estão bastante disseminadas entre os animais produtores de alimentos, reforçando a importância de uma abordagem *One Health* para melhor monitorizar e controlar as ameaças em saúde pública.

Relativamente à serotipagem e genotipagem dos isolados de interesse e à sua potencial relação com infeções em humanos, é de referir que *Salmonella* Enteritidis, um dos serotipos identificados, está entre os agentes patogénicos de origem alimentar mais prevalente em todo o mundo (38). O ST11, encontrado neste estudo associado a *Salmonella* Enteritidis tem sido relacionado com surtos recentes em vários países da Europa (39,40). O serotipo *Salmonella* Veneziana, isolado neste estudo de uma amostra de fezes de ouriço, já foi isolado em humanos (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica> [acedido em 6/12/2023]) e já foi potencialmente associado a um caso terminal de ileíte aguda (45). *Campylobacter coli*, espécie identificada neste trabalho na amostra de fezes da gineta, é a segunda espécie de *Campylobacter* mais frequentemente relatada em infeções em humanos (42). O ST1595 identificado já foi isolado de humanos com campylobacteriose (<https://pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli> [acedido em 6/10/2022]). O serovar *Campylobacter hyointestinalis*, isolado aqui de 7 amostras de javalis, já foi isolado de diversas espécies animais e é um membro emergente das espécies de *Campylobacter* capaz de causar doença em humanos (43). Com referência aos resultados da tipagem de *E. coli*, é relevante mencionar que três dos antigénios O identificados pertencem aos 20 serogrupos mais frequentemente relatados em casos confirmados de infeções humanas por STEC na UE/EEE em 2015–2017 (O145, O146, O121) (44). Além disso, o serotipo O26:H11, que é considerado como um dos mais comuns em estirpes STEC não-O157, causando doença em humanos em muitos países (45), foi detetado, neste estudo, numa amostra de fezes de gamo. Duas das *Sequence types* (ST) de *E. coli* que foram mais frequentemente detetadas (ST442 e ST738) neste estudo, já foram previamente relacionadas com casos de doença humana (46,47).

Em relação à análise de *clusters* dos 52 isolados patogénicos de *E. coli*, é de realçar que seis dos nove *clusters* identificados compreendem estirpes isoladas de diferentes espécies, evidenciando transmissão direta ou indireta destes isolados entre animais coabitando na Tapada Nacional de Mafra. A multirresistência a antimicrobianos observada num dos isolados ST137 que formam um *cluster* (figura 1), poderá ter sido adquirida por transferência horizontal de genes. Não é de descartar a hipótese da circulação de determinantes de resistência a antimicrobianos na Tapada Nacional de Mafra estar, eventualmente, relacionada com a proximidade entre a população estudada e os humanos, durante as visitas ou as atividades de caça. O rio que atravessa a Tapada Nacional de Mafra, pode também ser uma interface entre vida selvagem, animais que se destinam à produção alimentar e seres humanos a ter em consideração.

Conclusão

Foi atingido um patamar sem precedentes numa variedade de fatores relacionados com a ecologia e transmissão de doenças (nomeadamente a pressão crescente dos seres humanos sobre os ecossistemas naturais e as interações crescentes entre as diferentes espécies), sendo esta uma preocupação para o controlo de doenças na vida selvagem. A vigilância sanitária animal é reconhecida como um elemento-chave na prevenção de riscos em saúde pública relacionados com doenças zoonóticas emergentes.

O presente estudo confirma que os animais selvagens constituem importantes reservatórios de agentes patogénicos zoonóticos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., incluindo estirpes resistentes/ multirresistentes a antimicrobianos. Estes resultados reforçam a importância de uma abordagem *One Health*, mostrando que uma melhor compreensão da ecologia comunitária é essencial para uma melhor compreensão das ligações epidemiológicas entre todos os intervenientes do *continuum* vida selvagem, animais que se destinam à produção alimentar e seres humanos.

Este artigo corresponde a uma versão reduzida em português do artigo: Pista A, Silveira L, Ribeiro S, Fontes M, Castro R, Coelho A, Furtado R, Lopes T, Maia C, Mixão V, Borges V, Sá A, Soeiro V, Correia CB, Gomes JP, Saraiva M, Oleastro M, Batista R. *Pathogenic Escherichia coli, Salmonella spp. and Campylobacter spp. in Two Natural Conservation Centers of Wildlife in Portugal: Genotypic and Phenotypic Characterization*. *Microorganisms*. 2022 Oct 27;10(11):2132. doi: 10.3390/microorganisms10112132

Referências bibliográficas:

- (1) Hassell JM, Begon M, Ward MJ, et al. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. *Trends Ecol Evol*. 2017 Jan;32(1):55-67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
- (2) Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1842-7. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>
- (3) Martins SB, Häslér B, Rushton J. Economic Aspects of Zoonoses: Impact of Zoonoses on the Food Industry. In: Sing, A. (ed) *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals*. Dordrecht: Springer, 2014. pp. 1107-26. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2_45
- (4) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2022 Dec 13;20(12):e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- (5) Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, et al. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *Ecohealth*. 2019 Jun;16(2):378-90. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>. Erratum in: *Ecohealth*. 2019 Jun 5.
- (6) Latif AA, Mukaratirwa S. Zoonotic origins and animal hosts of coronaviruses causing human disease pandemics: A review. *Onderstepoort J Vet Res*. 2020 Dec 21;87(1):e1-e9. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1895>
- (7) Massei G, Kindberg J, Licoppe A, et al. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag Sci*. 2015 Apr;71(4):492-500. <https://doi.org/10.1002/ps.3965>
- (8) Mora A, López C, Dhahi G, et al. Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Apr;78(8):2578-85. <https://doi.org/10.1128/AEM.07520-11>
- (9) Bertelloni F, Cilia G, Bogi S, et al. Pathotypes and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Wild Boar (*Sus scrofa*) in Tuscany. *Animals (Basel)*. 2020 Apr 24;10(4):744. <https://doi.org/10.3390/ani10040744>
- (10) Alonso CA, Mora A, Díaz D, et al. Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. *Vet Microbiol*. 2017 Aug;207:69-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.028>
- (11) Sannó A, Aspán A, Hestvik G, et al. Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. *Epidemiol Infect*. 2014 Dec;142(12):2542-7. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000119>
- (12) Sánchez S, Martínez R, García A, et al. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet Microbiol*. 2010 Jul 14;143(2-4):420-3. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.016>

artigos breves_ n. 4

- (13) Navarro-Gonzalez N, Porrero MC, Mentaberre G, et al. *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars (*Sus scrofa*) and Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sharing pastures with free-ranging livestock in a natural environment in Spain. *Vet Q.* 2015 Jun;35(2):102-6. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1023404>
- (14) Dias D, Caetano T, Torres RT, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild ungulates. *Sci Total Environ.* 2019 Feb 15;651(Pt 1):203-209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.162>
- (15) Szczerba-Turek A, Socha P, Bancercz-Kisiel A, et al. Pathogenic potential to humans of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from wild boars in Poland. *Int J Food Microbiol.* 2019 Jul 2;300:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.004>
- (16) Navarro-Gonzalez N, Casas-Díaz E, Porrero CM, et al. Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Vet Microbiol.* 2013 Dec 27;167(3-4):686-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.037>
- (17) Wachek S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A, et al. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 Mar;7(3):307-12. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0367>
- (18) Marotta F, Di Marcantonio L, Janowicz A, et al. Genotyping and Antibiotic Resistance Traits in *Campylobacter jejuni* and *coli* From Pigs and Wild Boars in Italy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Oct 15;10:592512. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.592512>
- (19) Mokracka J, Krzysińska S, Altunin D, et al. In vitro virulence characteristics of rare serovars of *Salmonella enterica* isolated from sand lizards (*Lacerta agilis* L.). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018 Oct;111(10):1863-70. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1079-8>
- (20) Pista A, Silveira L, Ribeiro S, et al. Pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in Two Natural Conservation Centers of Wildlife in Portugal: Genotypic and Phenotypic Characterization. *Microorganisms.* 2022 Oct 27;10(11):2132. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112132>
- (21) ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- (22) ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method
- (23) Grimont PAD, Weill FX; WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf
- (24) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022.
- (25) Mixão V, Pinto M, Sobral D, et al. ReporTree: a surveillance-oriented tool to strengthen the linkage between pathogen genetic clusters and epidemiological data. *Genome Med.* 2023 Jun 15;15(1):43. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01196-1>
- (26) Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018 Sep;28(9):1395-1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
- (27) Kemper N, Aschfalk A, Höller C. *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and *Cryptosporidium* oocysts in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Northern Finland and Norway. *Acta Vet Scand.* 2006 Jun 14;48(1):7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-48-7>
- (28) Lillehaug A, Bergsjø B, Schau J, et al. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet Scand.* 2005;46(1-2):23-32. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-46-23>
- (29) Cilia G, Turchi B, Fratini F, et al. Prevalence, Virulence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in European Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Tuscany (Central Italy). *Pathogens.* 2021 Jan 20;10(2):93. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020093>
- (30) Sannö A, Rosendal T, Aspán A, et al. Distribution of enteropathogenic *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in the Swedish wild boar population, and assessment of risk factors that may affect their prevalence. *Acta Vet Scand.* 2018 Jul 3;60(1):40. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0395-3>
- (31) Zottola T, Montagnaro S, Magnapera C, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonella in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region - Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013 Mar;36(2):161-8. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.004>
- (32) Gil Molino M, García Sánchez A, Risco Pérez D, et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates. *Transbound Emerg Dis.* 2019 May;66(3):1218-1226. <https://doi.org/10.1111/tbed.13140>
- (33) Navarro-Gonzalez N, Mentaberre G, Porrero CM, et al. Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *PLoS One.* 2012;7(12):e51614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051614>
- (34) Navarro-Gonzalez N, Ugarte-Ruiz M, Porrero MC, et al. *Campylobacter* shared between free-ranging cattle and sympatric wild ungulates in a natural environment (NE Spain). *Ecohealth.* 2014 Sep;11(3):333-42. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0921-3>
- (35) Carbonero A, Paniagua J, Torralbo A, et al. *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;37(2):115-21. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.001>
- (36) Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022 Feb 12;399(10325):629-55. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0). Epub 2022 Jan 19. Erratum in: *Lancet.* 2022 Oct 1;400(10358):1102.
- (37) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J.* 2021 Apr 12;19(4):e06490. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>
- (38) Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol.* 2001 Jul;3(7):421-30. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00213.x>
- (39) European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to poultry products in the EU/EEA and the United Kingdom – 25 February 2021. Stockholm: ECDC/EFSA, 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/salmonella-enteritidis-multi-country-poultry-joint-outbreak-risk-assessment>
- (40) European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to eggs and egg products – 8 February 2022. Stockholm: ECDC/EFSA, 2022. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_Salmonella-Enteritidis-ST11_2022_final.pdf
- (41) Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, et al. Acute terminal ileitis mimicking Crohn's disease caused by *Salmonella veneziana*. *Int J Infect Dis.* 2001;5(4):225-7. [https://doi.org/10.1016/s1201-9712\(01\)90077-3](https://doi.org/10.1016/s1201-9712(01)90077-3)
- (42) Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, et al. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):687-720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- (43) Wilkinson DA, O'Donnell AJ, Akhter RN, et al. Updating the genomic taxonomy and epidemiology of *Campylobacter hyointestinalis*. *Sci Rep.* 2018 Feb 5;8(1):2393. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20889-x>
- (44) European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 2018 Dec 12;16(12):e05500. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- (45) Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 2013 May;56(10):1373-81. <https://doi.org/10.1093/cid/cit055>
- (46) Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, et al. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1474-7. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090161>
- (47) Fierz L, Cernela N, Hauser E, et al. Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated during 2010-2014 from Human Infections in Switzerland. *Front Microbiol.* 2017 Aug 3;8:1471. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01471>