



## Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 e APEC em amostras de água da produção avícola

### Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and APEC in water samples of poultry production

Priscila Diniz Lopes\*<sup>1</sup> , Tatiane Hass<sup>2</sup> , Maria do Ó Mendes da Rosa<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> JBS S. A./ Seara Alimentos, Nuporanga, São Paulo, Brasil.

\*Autor correspondente: prisciladiniz\_vet@yahoo.com.br

**Resumo:** *Escherichia coli* são bactérias comensais e estão presentes no ambiente. Entretanto, alguns patotipos podem causar doenças em animais e humanos. *E. coli* APEC causa a colibacilose em aves, provocando sinais respiratórios e sistêmicos. O sorotipo enterohemorrágico O157:H7 causa infecções transmitidas por alimentos em humanos, provocando quadros de diarreia hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. O objetivo do estudo foi detectar os sorotipos *E. coli* APEC e O157:H7 em amostras de água em diferentes pontos da produção avícola e avaliar os perfis de resistência antimicrobiana. A análise de PCR foi realizada para detectar os padrões dos genes *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* e *ompT* de *E. coli* APEC e o antígeno flagelar H7 e as toxinas *Stx1* e *Stx2* de *E. coli* O157:H7. Trinta e três amostras de água de diferentes pontos foram positivas para *E. coli*, entre elas, oito para APEC e nenhuma para O157:H7. Os isolados de APEC apresentaram diferentes graus de suscetibilidade aos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** *E. coli*; colibacilose; patotipos; aves; produção.

**Abstract:** *Escherichia coli* are commensal bacteria and are present in the environment. However, some pathotypes can cause disease in animals and humans. *E. coli* APEC causes colibacillosis in chickens, inducing respiratory and systemic symptoms. Enterohemorrhagic serotype O157:H7 causes foodborne infections in humans, with hemorrhagic diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. The objective was to detect the *E. coli* APEC and O157:H7 serotypes in water samples from different points from the poultry production, and to evaluate the antimicrobial resistance profiles. PCR analysis was performed to detect the patterns of genes *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* and *ompT* from *E. coli* APEC and the H7 flagellar antigen and the *Stx1* and *Stx2* toxins from *E. coli* O157:H7. Thirty-three water samples from different points were positive for *E. coli*, among them, eight for APEC and none for O157:H7. APEC isolates showed different degrees of susceptibility to antimicrobials.

**Keywords:** *E. coli*; colibacillosis; pathotypes; chickens; production.

Recebido: 13 de maio, 2024. Aceito: 31 de julho, 2024. Publicado: 30 de setembro, 2024.

## 1. Introdução

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* (*Escherichia coli*) serem consideradas comensais e estarem presentes no ambiente, algumas cepas apresentam fatores de virulência e podem causar doenças nos hospedeiros, sendo classificadas em patótipos como *E. coli* patogênica extra-intestinal (*Extraintestinal Pathogenic E. coli* - ExPEC) e intestinal (*Intestinal Pathogenic E. coli* - IPEC) <sup>(1-4)</sup>. Além da patogenicidade de alguns sorotipos de *E. coli*, outro fato importante é em questão a saúde pública, na qual essa bactéria é uma das principais envolvidas a resistência de antimicrobianos, especialmente aqueles utilizados na produção animal <sup>(1,5)</sup>.

ExPEC tem seis subpatotipos: UPEC (*E. coli* uropatogênicas), NMEC (*E. coli* associada a meningite neonatal), APEC (*E. coli* patogênica para as aves), SePEC (*E. coli* causadora de septicemia), MPEC (*E. coli* patogênica mamária) e EnPEC (*E. coli* endometrial patogênica) <sup>(4)</sup>. APEC é um subpatotipo que causa doença em aves, envolvido com infecções respiratórias e sistêmicas, conhecida como colibacilose. A patogenicidade deste patótipo pode estar ligada a fatores de virulência, previamente estudados, que geralmente apresentam padrões de quatro ou cinco genes: *hlyF* (produção de toxinas), *iutA* and *iroN* (aquisição de ferro), *iss* e *ompT* (protectinas) <sup>(6,7)</sup>. Os genes citados são os mais prevalentes em isolados de diferentes partes do mundo, como Estados Unidos, Tailândia, Coreia e Austrália. Apesar disso, outros estudos utilizando sequenciamento genético, tornaram-se uma ferramenta para complementar com informações mais relevantes, incluindo outros genes como fatores de virulência <sup>(8)</sup>. APEC é uma das doenças bacterianas mais comuns nas produções avícolas, causando grandes prejuízos econômicos. A doença se manifesta de diversas formas, como peritonite, salpingite, artrite, aerossaculite, e pode estar relacionada à alta morbidade e mortalidade do lote <sup>(8)</sup>.

Dentre os patótipos de IPEC, há um grupo de *E. coli* diarreiogênica (DEC) que possui o sorotipo enterohemorrágico O157:H7, capaz de causar infecções alimentares em humanos, com diarreia hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), considerada de grande importância em saúde pública <sup>(4,5)</sup>. O sorotipo O157:H7 produz uma verotoxina (VTEC), conhecida como toxina Shiga (*Stx*), uma citotoxina potente e codificada por bacteriófagos, que é o principal marcador de virulência deste sorotipo. O sorotipo O157 é frequentemente associado ao antígeno H7 (codificado por *fliC* H7) <sup>(9)</sup>. Este microrganismo pode colonizar o trato gastrointestinal das aves sem causar doença, porém pode servir como fonte de contaminação das carcaças de frango no abatedouro, e conseqüentemente um risco à saúde humana <sup>(5)</sup>.

A qualidade da água nas granjas é essencial no controle de patógenos de interesse em saúde humana e animal, podendo ser fonte de infecção de *E. coli* pela via oro-fecal das aves <sup>(1)</sup>. A pesquisa fornecerá informações importantes sobre a transmissão de APEC e O157:H7, e suas potenciais ameaças à saúde pública por meio da resistência antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *E. coli* APEC e O157:H7 em água bruta e tratada de diferentes ciclos de produção avícola e testar a sensibilidade a antibióticos.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Isolamento de *E. coli*

Amostras de água de poço e tratadas foram coletadas em diferentes granjas avícolas localizadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso. Amostras de água (100 mL) foram testadas com substrato cromogênico (Colilert, Laboratório IDEXX). Após a confirmação da positividade para *E. coli*, 100 µL da amostra foi cultivada em placa contendo ágar MacConkey, e incubada entre 18 e 24 horas a 37°C. Colônias com características morfológicas de *E. coli* foram cultivadas em meios bioquímicos para confirmação, e então semeadas em ágar nutriente.

### 2.2 Extração de DNA

Três colônias de cada amostra foram inoculadas em 200 µL de tampão PBS (Tampão fosfato-salino 1x). Em seguida, o DNA da amostra foi extraído usando o kit Indimag Pathogen no equipamento Indimag 48, de acordo com as especificações do fabricante.

### 2.3 Detecção de *E. coli* O157:H7

Os primers utilizados para detecção do antígeno flagelar H7 <sup>(10)</sup> e das toxinas *Stx1* e *Stx2* <sup>(11)</sup> de *E. coli* O157:H7 foram sintetizados conforma as sequências da Tabela 1. O mix de PCR foi preparado usando o kit de PCR QuantiFast SyBR Green (Qiagen®), os primers e a amostra de DNA extraída, seguindo o perfil de ciclos conforme especificação do fabricante. Os ciclos foram: ativação inicial da PCR (5 minutos a 95°C), e duas ciclagens subsequentes: 35 ciclos de desnaturação (10 segundos a 95°C) e a combinação de anelamento e extensão (30 segundos a 60°C). Após a amplificação, amostras com Ct ≤32 foram analisadas para avaliar a curva de *melting* e com a temperatura, tendo como comparação o controle positivo (ATCC 43888).

**Tabela 1.** Primers e probes TaqMan utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Sequências de oligonucleotídeos (59–39)	Tamanho do produto (pares de bases)	Referências
<i>fliC</i>	F: ATAATCTACGCCCAACT R: GACTCCATCCAGGACGAAA	381	Goma et al., 2019
<i>Stx1</i>	F: GTCACAGTAACAAACCGTAACA R: TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA	95	Jothikumar & Griffiths, 2002
<i>Stx2</i>	F: CGACCCCTCTTGAACATA R: GATAGACATCAAGCCCTCGT	108	Jothikumar & Griffiths, 2002
<i>iss</i>	F: CGGGAATTGGACAAGAGAAAAC R: TTTCTGCACCGCCACAAA FAM: TTTGGCTGCATCAAC - ZEN-IOWA BLACK FQ	57	Ikuta et al., 2014
<i>iutA</i>	F: CGGTGGCGTACGCTATCAGT R: GCGCGTAGCCGATGAAAT VIC: CACTGAAAACAAGATTGAT - MGB	59	Ikuta et al., 2014
<i>hlyF</i>	F: GGTTGCCCGACCATCAATT R: ACTGGTTGAAGTAAGCACCTAA FAM: TTGTTGGCCACAGTCG - MGB	61	Ikuta et al., 2014

<i>ompT</i>	F: GGTTCCGGGATTGCTCGTAT	57	Ikuta et al., 2014
	R: GGTCGTGGAGGCAATATGGT		
	VIC: CAGCCAGTCCCTGTC - MGB		
<i>iroN</i>	F: CCGTTGGTGCAGAGTGGAA	53	Ikuta et al., 2014
	R: CAGGCTGGTAGAGGAAGGATCA		
	FAM: CGCGATAAGCTCG - MGB		

F: primer forward; R: primer reverse; TaqMan FAM e VIC: corante reporter; TaqMan MGB e ZEN-IOWA BLACK FQ: corante quencher.

## 2.4 Detecção de *E. coli* APEC

As sequências de primers e TaqMan para detecção dos genes de virulência *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss*, and *ompT* <sup>(7)</sup> foram sintetizados conforme Tabela 1. O master mix foi preparado utilizando o kit QuantFast Probe PCR (Qiagen®), os primers, a TaqMan e o DNA extraído da amostra, seguindo a ciclagem conforme orientações do fabricante. A ciclagem seguida foi: ativação inicial da PCR (3 minutos a 95°C) e duas ciclagens subsequentes: 35 ciclos de desnaturação (3 segundos a 95°C) e a combinação de anelamento e extensão (30 segundos a 60°C). Depois da ciclagem, detecções dos genes com Ct ≤32 foram consideradas positivas, e a amostra foi considerada *E. coli* APEC quando apresentasse positividade para 4 ou mais genes amplificados.

## 2.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Amostras positivas para APEC ou O157:H7 foram recuperadas do ágar estoque e cultivadas em ágar Mueller Hinton (MH). A multiplicação de colônias em ágar MH foi usada para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de Difusão de discos de acordo com o Guia do Instituto de padrões de laboratório e clínico (CLSI) <sup>(12)</sup>. Os antibióticos testados foram Amoxicilina (10 µg), Canamicina (30 µg), Ceftiofur (30 µg), Doxiciclina (30 µg), Enrofloxacina (5 µg), Fosfomicina (50 µg), Gentamicina (10 µg), Lincomicina + Espectinomicina (109 µg), Neomicina (30 µg), Norfloxacina (10 µg), Oxitetraciclina (30 µg), Sulfonamida (300 µg), Tetraciclina (30 µg).

## 3. Resultados

Setenta e duas amostras de água foram analisadas e 33 foram positivas para *E. coli* (Tabela 2). Dentre as 33 amostras, oito foram positivas para APEC na PCR e nenhuma para O157:H7. Sete estirpes de APEC foram positivas para os cinco genes de virulência analisados (*ompT*, *iroN*, *hlyF*, *iutA*, *iss*), e uma foi positiva para 4 genes (*ompT*, *iroN*, *hlyF*, *iss*).

Tabela 2. Amostras de *E. coli* isoladas de água em diferentes pontos da cadeia avícola

Amostra	Granja	Idade	<i>E. coli</i> APEC	<i>E. coli</i> O157:H7
Água tratada	Avós	Vazio sanitário	P	N
Água tratada	Avós	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Avós	15 semanas	N	N
Água tratada	Matrizes	8 semanas	N	N
Água tratada	Incubatório	-	N	N
Água tratada	Incubatório	-	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água tratada	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água tratada	Frango de corte	40 dias	N	N
Água tratada	Frango de corte	14 dias	P	N
Água tratada	Frango de corte	25 dias	N	N
Água tratada	Frango de corte	10 dias	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	P	N
Água bruta	Frango de corte	Vazio sanitário	N	N
Água bruta	Frango de corte	40 dias	N	N

N: Negativo; P: Positivo

O resultado do teste de susceptibilidade a antimicrobianos com as cepas de APEC consta na Figura 1. Foi observado que as cepas de APEC apresentaram diferentes graus de susceptibilidade aos antimicrobianos testados Amoxicilina, Canamicina, Ceftiofur, Doxiciclina, Enrofloxacina, Lincomicina + Spectinomicina, Neomicina, Oxitetraciclina, Sulfonamida, Tetraciclina, Fosfomicina, Gentamicina e Norfloxacina. Dois isolados testados (25%) foram resistentes a Doxiciclina, Oxitetraciclina, Sulfonamida e Tetraciclina, e uma estirpe (12.5%) foi resistente a Amoxicilina e Lincomicina + Spectinomicina.

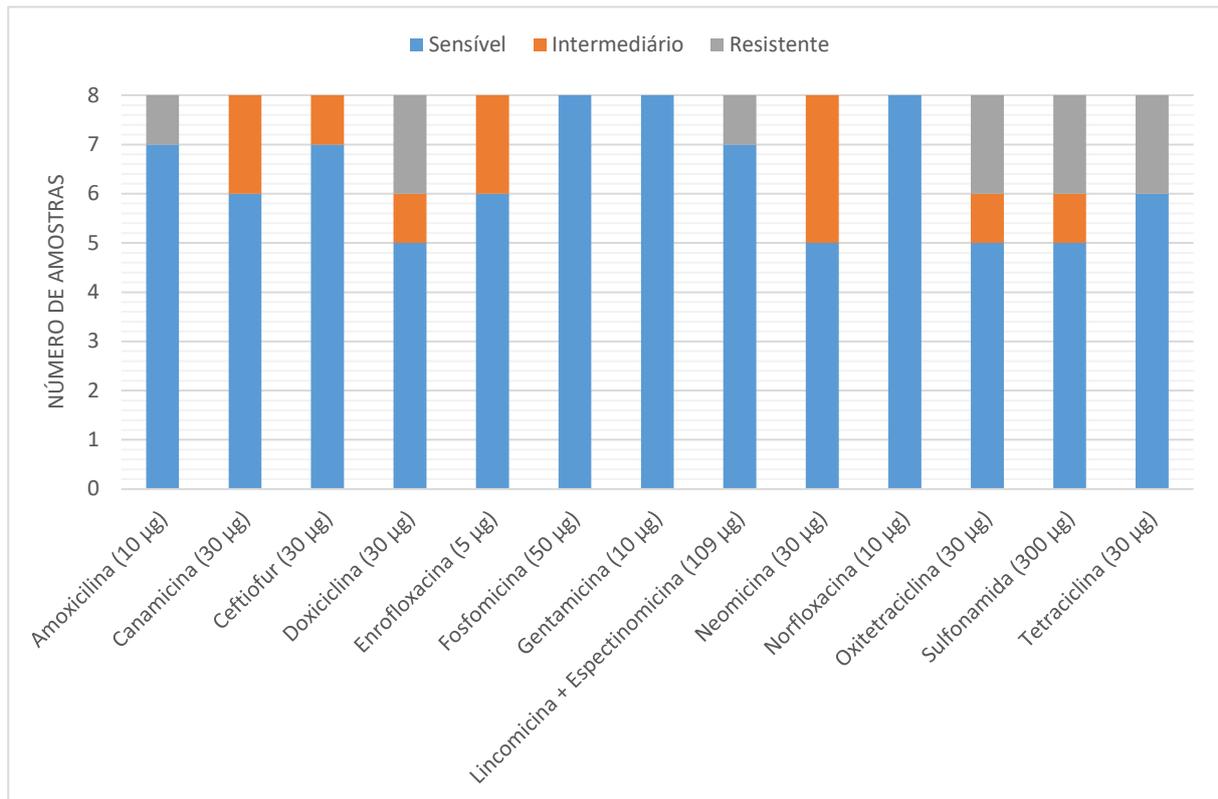


Figura 1. Perfil dos isolados de *Escherichia coli* APEC em relação a susceptibilidade aos antibióticos.

#### 4. Discussão

Os genes de virulência selecionados para o estudo (*hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss*, and *ompT*) são os mais predominantes nas estirpes de APEC, entretanto outros sets de genes também têm sido detectados como *tsh*, *iuc*, *fim*, *neuS*, *cvi*, *astA*, *vat*, *irp2*, *iucD*, *papC*, *cva-cvi* <sup>(7,13)</sup>. A ausência do gene *iutA*, como visto em uma das cepas estudadas, tem sido comumente observada em outros trabalhos, e pode estar relacionado à origem geográfica ou mesmo ao perfil patogênico <sup>(14)</sup>. *E. coli* O157:H7 é um dos principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a contaminação de bebida com *E. coli* O157:H7 <sup>(15)</sup> e a presença deste patógeno nas fezes de frango. A contaminação da carcaça no abatedouro pode provocar grandes perdas econômicas devido o bloqueio do produto <sup>(16)</sup>. Em nosso estudo, *E. coli* O157:H7 não foi detectada em nenhuma amostra analisada. Por isso, a importância de conhecer o cenário atual e positivo da produção avícola em relação a esse patógeno.

As estirpes de APEC isoladas no estudo demonstraram diferentes graus de susceptibilidade para as 13 moléculas de antibióticos testadas. Apenas 25% foram resistentes a Doxiciclina, Oxitetraciclina e Sulfonamida + Tetraciclina, e 12.5% foi resistente a Amoxicilina e Lincomicina + Spectinomicina. Apesar dos baixos graus de resistência à antimicrobianos das cepas de *E. coli* APEC isoladas no estudo, sabe-se que esse é um tema que gera preocupação a nível mundial, e por isso, monitoramentos devem ser realizados para controlar as taxas de resistência que acontecem na produção. O uso descontrolado de antibióticos como promotores de crescimento, ou de forma inadequada e incorreta, podem resultar na seleção

de bactérias multirresistentes, em que estas podem compartilhar genes de resistência com outras bactérias, disseminando o problema <sup>(14)</sup>.

## 5. Conclusão

Estirpes de *E. coli* APEC com diferentes graus de suscetibilidade à antimicrobianos estão disseminadas na cadeia avícola, e a fonte de infecção para as aves pode vir de diferentes contaminações ambientais, incluindo água bruta e tratada. Embora a água bruta passe por tratamentos, vale ressaltar que desvios de biosseguridade podem resultar na contaminação da água potável e conseqüentemente a infecção das aves. O sorotipo de *E. coli* O157:H7 não foi isolado de amostras de água, sendo observado um cenário positivo no controle deste patógeno.

## Declaração de conflitos de interesse

Declaramos que não há conflitos de interesse.

## Contribuição dos autores

*Conceitualização:* P.D. Lopes. *Curadoria de dados:* P.D. Lopes. *Metodologia:* P.D. Lopes. *Gerenciamento do projeto:* P.D. Lopes. *Investigação:* T. Hass.; M.Ó.M. Rosa. *Análise formal:* T. Hass.; M.Ó.M. Rosa. *Escrita (rascunho original):* P. D. Lopes. *Escrita (revisão e edição):* P.D. Lopes.

## Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à equipe do Laboratório de Saúde Animal de Nuporanga-SP da empresa Seara Alimentos LTDA, JBS S.A., e à empresa Seara Alimentos LTDA, JBS S.A. pelos recursos disponibilizados para a realização do projeto.

## Referências

1. Swelum AA, Elbestawy AR, El-Saadony MT, Hussein EOS, Alhotan R, Suliman GM, Taha AE, Ba-Awadh H, El-Tarabily KA, El-Hack MEA. Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview. *Poultry Science*. 2021;100(5). doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101039>
2. Ramos S, Silva V, Dapkevicius M de LE, Caniça M, Tejedor-Junco MT, Igrejas G, Poeta P. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Production. *Animals*. 2020; 29;10(12):2239. doi: <https://doi.org/10.3390/ani10122239>
3. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*. 2021; 12;10(4):467. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
4. Filho HCK, Brito KCT, Cavalli LS, Brito BG. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) - an update on the control. In: Méndez-Vilas A, editor. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. 5<sup>th</sup> ed. Badajoz: Formatex Research Center; 2015: 598–618.
5. Shecho M, Thomas N, Kemal J, Muktar Y. Cloacal Carriage and Multidrug Resistance *Escherichia coli* O157:H7 from Poultry Farms, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*. 2017; 27: 1–9. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/8264583>
6. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(12):3987–96. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>
7. Ikuta N, de Oliveira Solla Sobral F, Lehmann FKM, da Silveira VP, de Carli S, Casanova YS, Celmer AJ, Fonseca ASK, Lunge VR. Taqman Real-Time PCR Assays for Rapid Detection of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Avian Diseases*. 2014;58(4):628–31. doi: <https://doi.org/10.1637/10871-052414-ResNote.1>

8. Joseph J, Zhang L, Adhikari P, Evans JD, Ramachandran R. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in Broiler Breeders: An Overview. *Pathogens*. 2023; 26;12(11):1280. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens12111280>
9. Ferdous M, Kooistra-Smid AMD, Zhou K, RossenJWA, Friedrich AW. Virulence, Antimicrobial Resistance Properties and Phylogenetic Background of Non-H7 Enteropathogenic *Escherichia coli* O157. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 28;7. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01540>
10. Goma MKE, Indraswari A, Haryanto A, Widiastih DA. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga toxin 2a gene in pork, pig feces, and clean water at Jagalan slaughterhouse in Surakarta, Central Java Province, Indonesia. *Veterinary World*. 2019; 19;12(10):1584–90. doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1584-1590>
11. Jothikumar N, Griffiths MW. Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(6):3169–71. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3169-3171.2002>
12. CLSI supplement M100, editor. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. 332 p.
13. Knöbl T, Micke Moreno A, Paixão R, Gomes TAT, Vieira MAM, Leite DS, Blanco JE, Ferreira AJP. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. *The Scientific World Journal*. 2012 :1–7. doi: <https://doi.org/10.1100/2012/437342>
14. Meguenni N, Chanteloup N, Tourtereau A, Ahmed CA, Bounar-Kechih S, Schouler C. Virulence and antibiotic resistance profile of avian *Escherichia coli* strains isolated from colibacillosis lesions in central of Algeria. *Vet World*. 2019; 25;12(11):1840–8. doi: [www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1840-1848](http://www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1840-1848)
15. Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*. 2012;45(2):587–602. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.037>
16. S. Sadeqi, Heidariyeh P, Qorbani M, Nikkhahi F, Marashi SMA. Evaluation of Multiplex-PCR for Simultaneous Identification of *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli* O157: H7 in Poultry. *Infection Epidemiology and Microbiology*. 2019;5(3):13–8.