

ÉRICA DE LIMA ORI

**Perfil de genes de virulência e diversidade clonal de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enteropatogênica atípica (aEPEC) do sorotipo O26:H11**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de mestra em Ciências.

**Área de Concentração:** Vigilância em Saúde Pública.

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Fernando dos Santos

**SÃO PAULO**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ori, Érica de Lima

Perfil de genes de virulência e diversidade clonal de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enteropatogênica atípica (aEPEC) do sorotipo O26:H11 / Érica de Lima Ori. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luís Fernando dos Santos.

1. *Escherichia coli*/classificação. 2. *Escherichia coli* Enteropatogênica/classificação. 3. *Escherichia coli* Shiga Toxigênica/classificação. 4. Fatores de virulência/genética. 5. Variação genética/genética. 6. Tipagem de Sequências Multilocus/métodos.

SES/CCD/CD - 413/2020

Elaborada por Lilian Nunes Schiavon CRB 8/4083

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Cleuza e Mitsuki Ori exemplos de dedicação e  
determinação.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, Jesus Cristo, que me deu sabedoria, força, fé e que abriu as portas para que eu estivesse no Lutz desenvolvendo este trabalho, e ainda enviou várias pessoas maravilhosas na minha área profissional para me ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Aos meus pais Cleuza e Mitsuaki Ori que sempre estiveram ao meu lado durante toda a minha vida e construíram um grande alicerce familiar para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

Ao Dr. Luís Fernando dos Santos, pela confiança, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e por me dar esta importante oportunidade profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo financeiro destinado a este trabalho científico.

Aos colegas do Centro de Bacteriologia que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente para os pesquisadores Carlos Henrique Camargo e Monique Tibas Casas, as colegas Amanda Bertani e Carol Pedacci pela ajuda e amizade.

Aos colegas Adriene Cavalcanti, Alex Reis e Sandra Schicariol pelo carinho, amizade e pela contribuição técnica a este trabalho.

**"Mas os que esperam no Senhor, renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam".**

**(Isaías 40:31 – Bíblia sagrada)**

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, e teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP 2017/00411-1) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Ori, E.L. Perfil de genes de virulência e diversidade clonal de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enteropatogênica atípica (aEPEC) do sorotipo O26:H11.**

**Resumo**

O sorotipo O26:H11 associado às aEPEC e STEC tem sido frequentemente implicado com doenças entéricas em diversos países. Análises comparativas de cepas O26:H11 STEC e aEPEC de vários países indicam que as aEPEC O26:H11 representam clones que perderam os genes *stx* através da excisão fágica. No Brasil, o isolamento de aEPEC O26:H11 de casos de infecção humana é frequente, sendo este um dos mais importantes sorotipos de aEPEC em nosso meio. O objetivo deste estudo foi investigar e fazer uma análise comparativa sobre a ocorrência de vários genes de virulência, alguns deles altamente específicos para o patotipo STEC, em cepas O26:H11 STEC e aEPEC, além de avaliar a diversidade clonal através das técnicas de PFGE e sequenciamento MLST. Oito das 10 cepas STEC apresentaram o genótipo *stx1a*, enquanto duas cepas apresentaram *stx2a*. Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de STEC O26:H11 albergando o genótipo *stx2a* no Brasil. Os genes plasmidiais *ehxA*, *katP*, *espP* e *toxB* foram encontrados em 8 (80%), 7 (70%), 8 (80%) e 8 (80%) das STEC. Todas as STEC abrigaram os genes *efa*, *escN*, *nleB*, *nleE*, *sen*, *z2098*, *z2099*, *z2121*, *ureD* e *terE*. Os genes *espK* e *espM1* foram encontrados em igual frequência.

Dentre as aEPEC, todas foram positivas para os genes *efa*, *escN*, *nleB*, *nleE*, *sen* e *z2121*. Os genes *ehxA*, *espP*, *espM1*, *iha*, *katP*, *toxB*, *z2098*, *z2099*, *espK*, *espV*, *espN*, *ureD* e *terE* estiveram presentes em 25 (66%), 25 (66%), 35 (92%), 31 (82%), 16 (42%), 18 (47%), 26 (68%), 26 (68%), 31 (82%), 13 (34%), 19 (50%), 26 (68%) e 30 (79%) das cepas, respectivamente. O gene *astA* foi encontrado em apenas três (8%) aEPEC e nenhuma das cepas estudadas apresentou *cdt-V*, *etpD* e *pagC*. Todas as STEC possuíram sequências CRISPR do tipo C e/ou D. Dentre as aEPEC além destes dois polimorfismos associados às sequências CRISPR, o tipo E também foi encontrado. A tipagem por PFGE revelou uma ampla diversidade genética tanto entre as STEC como entre as aEPEC. A tipagem por MLST, realizada em 24 das cepas de aEPEC e

STEC, sendo dez STECs e 14 aEPEC, demonstrou que nem todas tiveram um ST válido de acordo com o banco Enterobase; em apenas 18 das cepas estudadas foi possível definir um, e todos pertencentes ao complexo clonal 29. Os STs 21 e 29 ocorreram igualmente, em quatro STECs cada. Dentre as aEPEC duas eram ST21 e oito pertenciam ao ST29.

A maioria das cepas de aEPEC O26:H11 do nosso estudo demonstraram várias características compatíveis com STEC sendo, portanto derivadas deste patotipo.

**Palavras-chave:** *E.coli*, aEPEC, STEC, fatores de virulência, variação genética, Tipagem de Sequências Multilocus.



**Ori, E.L. Profile of virulence and clonal diversity genes of *Escherichia coli* producing toxin Shiga (STEC) and atypical enteropathogenic (aEPEC) serotype O26:H11**

**Abstract**

The O26: H11 serotype which is associated with pathotypes aEPEC and STEC, is implicated with enteric diseases in several countries. Comparative analyzes of O26:H11 STEC and aEPEC strains from several countries indicated that many aEPEC strains represent STEC clones that lost the *stx* genes through phage excision. The aim of this study was to investigate the occurrence of several virulence genes, some of which highly specific for the STEC pathotype, in strains O26:H11 STEC and aEPEC, and to evaluate clonal diversity employing of PFGE and MLST aproches. Eight of the 10 STEC strains presented *stx1a* subtype, while two strains presented *stx2a*. This is the first report on the occurrence of STEC O26: H11 harboring the *stx2a* genotype in Brazil. The plasmidial genes *ehxA*, *katP*, *espP* and *toxB* were found in 8 (80%), 7 (70%), 8 (80%) and 8 (80%) of STEC. All STECs harbored the *efa*, *escN*, *nleB*, *nleE*, *sen*, *z2098*, *z2099*, *z2121*, *ureD* and *terE* genes. The *espK* and *espM1* genes were found at the same frequency.

Among aEPEC, all were positive for the *efa*, *escN*, *nleB*, *nleE*, *sen* and *z2121* gene. The genes *ehxA*, *espP*, *espM1*, *iha*, *katP*, *toxB*, *z2098*, *z2099*, *espK*, *espV*, *espN*, *ureD* and *terE* were present in 25 (66%), 25 (66%), 35 (92%), 31 ( 82%), 16 (42%), 18 (47%), 26 (68%), 26 (68%), 31 (82%), 13 (34%), 19 (50%), 26 (68%) ) and 30 (79%). The *astA* gene was found in only three (8%) aEPEC and none of these strains showed the presence of *cdt-V*, *etpD* and *pagC*.

All STECs presented CRISPR sequences, being C+D CRISPR types. Among the aEPEC in addition to these two polymorphisms associated with CRISPR sequences, type E was also found. PFGE typing revealed a wide genetic diversity both between STEC and aEPEC. MLST typing was performed on 24 strains of aEPEC and STEC, ten STECs and 14 aEPEC, but not all strains had a valid ST through the Enterobase bank, only 18 strains presented ST, and all these ST

belonged to the clonal complex 29. ST21 and ST29 occurred equally, in four STECs each. Among the aEPEC, two were ST21 and eight belonged to ST29.

Most strains of aEPEC O26: H11 in our study demonstrated several characteristics compatible with STEC and are therefore derived from this pathotype.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, Shiga Toxigenic *Escherichia coli*, virulence factors, genetic diversity, Multilocus Sequence Type.

## Lista de abreviaturas e siglas

A/E	Lesão <i>attaching and effacing</i>
<i>adK</i>	Gene da adenilsuccinato kinase
AL	Adesão localizada
ALL	Adesão localizada-like
<i>astA</i>	Gene da enterotoxina estável ao calor de EAEC
Bfp	Bundle Forming Pillus
<i>cdtV</i>	Gene da citotoxina letal distensora
CH	Colite hemorrágica
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas e regularmente interespaçadas
DAEC	<i>E.coli</i> difusamente aderente
<i>eae</i>	Gene da intimina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<i>efa</i>	Gene do fator de adesão de EHEC
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
<i>ehx</i>	Gene da enterohemolisina
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
aEPEC	EPEC atípica
tEPEC	EPEC típica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
<i>etpD</i>	Gene da via de secreção tipo II
<i>escN</i>	Gene da proteína N secretada pela <i>E.coli</i>
<i>espP</i>	Gene da serino protease extracelular
GB3	Globotriosilceramida
GB4	Globotetraosilceramida
<i>gyrB</i>	Gene da subunidade B da girase
<i>fliC</i>	Gene da flagelina
<i>fumC</i>	Gene da fumarato redutase
<i>icd</i>	Gene da isocitrato desidrogenase
<i>iha</i>	Gene da adesina homóloga a IrgA
<i>katP</i>	Gene da catalase peroxidase

<i>mdh</i>	Gene do malato desidrogenase
MLST	Tipagem por Sequenciamento de Locus Múltiplos
<i>nleB</i>	Gene que codifica o efector não <i>LEE</i> da proteína B
<i>nleE</i>	Gene que codifica o efector não <i>LEE</i> da proteína E
OI	Ilha de patogenicidade
<i>pagC</i>	Gene ativado por <i>phoP</i>
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pEAF	Plasmídeo associado ao fator de aderência de EPEC
<i>purA</i>	Gene da adenilsuccinato sintetase
<i>recA</i>	Gene da recombinase A
<i>sen</i>	Gene da enterotoxina de <i>Shigella flexneri</i>
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina de Shiga
<i>terE</i>	Gene da resistência ao telurito
<i>tir</i>	Gene que codifica o receptor translocado de intimina
<i>toxB</i>	Gene da adesina ToxB
<i>ureD</i>	Gene da urease
<i>wzx</i>	Gene da flipase do antígeno O

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Lesão histológica induzida por EPEC e organização genética do Locus *LEE*.....**22**
- Figura 2.** Padrões de adesão às células HeLa cultivadas *in vitro* expressos por cepas de EPEC.....**23**
- Figura 3.** Efeito citotóxico sobre células Vero característico da toxina Stx produzida por cepas STEC.....**39**
- Figura 4.** Curva padrão dos genes *Z2098*, *Z2099* e *Z2121*, demonstrando linearidade após sucessivas diluições de DNA da cepa EDL 933.....**49**
- Figura 5.** Gel de agarose representativo de um ensaio de PCR para pesquisa dos genes *stx* e *eae* (5A) e *bfpB* (5B) em cepas de *E.coli* O26:H11.....**62**
- Figura 6.** Gel de agarose representativo de um ensaio de PCR para a subtipagem dos genes *stx* nas cepas STEC O26:H11.....**63**
- Figura 7.** Gel de agarose ilustrando a amplificação de um fragmento de 811 pb correspondente ao alelo  $\beta$ 1 do gene *eae* nas cepas STEC e aEPEC O26:H11.....**64**
- Figura 8.** Ocorrência de sequências genéticas associadas aos genes *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, *iha* e *astA* em cepas de STEC e aEPEC O26:H11.**65**
- Figura 9.** Ensaio para pesquisa da expressão de beta hemolisina (enterohemolisina de EHEC) em cepas STEC e aEPEC O26:H11.....**66**
- Figura 10.** Distribuição dos genes *Z2098*, *Z2099*, *Z2121*, *ureD*, *espV*, *espK*, *espN* e *espM1* e *terE* associados às ilhas genômicas diversas, em cepas STEC e aEPEC do sorotipo 26:H11.....**67**
- Figura 11.** Dendrograma dos genes de virulência das cepas de STEC O26:H11.....**68**
- Figura 12.** Dendrograma dos genes de virulência das cepas de aEPEC O26:H11.....**69**
- Figura 13.** Perfis de polimorfismos associados aos *loci* CRISPR C, D e E, sorotipo-específicos em cepas de STEC e aEPEC O26:H11.....**70**

**Figura 14.** Gel representativo do perfil de macrorestrição genômica de cepas STEC e aEPEC O26:H11 após digestão do DNA total com a enzima *Xba*I e corrida eletroforética em aparato de eletroforese de campo pulsátil.....**71**

**Figura 15.** Dendrograma ilustrando a similaridade genética entre cepas STEC O26:H11.....**72**

**Figura 16.** Dendrograma ilustrando a similaridade genética entre cepas aEPEC O26:H11.....**73**

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos patótipos STEC e EPEC com base na ocorrência dos genes <i>stx</i> , <i>eae</i> e <i>bfp</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabela 2.</b> Primers e condições de amplificação empregadas nos ensaios de PCR convencional para caracterização dos patótipos aEPEC, STEC e do sorotipo O26:H11.....	<b>42</b>
<b>Tabela 3.</b> Primers e condições para amplificação nos ensaios para PCR convencional da subtipagem do gene <i>stx</i> .....	<b>43</b>
<b>Tabela 4.</b> Primers e condições de amplificação empregadas nos ensaios de PCR convencional para pesquisa de marcadores de virulência diversos associados a patótipos diarreio gênicos de <i>E. coli</i> .....	<b>44</b>
<b>Tabela 5.</b> Cepas de referência empregadas como controles positivos nos diversos ensaios de PCR convencional e PCR em tempo real para pesquisa de marcadores de virulência diversos associados a patótipos diarreio gênicos de <i>E.coli</i> .....	<b>46</b>
<b>Tabela 6.</b> Primers e sondas empregadas nos ensaios de PCR em tempo real para amplificação dos genes <i>Z2098</i> , <i>Z2099</i> , <i>Z2121</i> , <i>espK</i> , <i>espM1</i> , <i>espN</i> , <i>espV</i> e <i>ureD</i> .....	<b>51</b>
<b>Tabela 7.</b> Limite mínimo de detecção (LMD) e intervalos de CT estabelecidos para interpretação dos ensaios de PCR em tempo real para pesquisa dos genes <i>espK</i> , <i>espN</i> , <i>espM1</i> , <i>espV</i> , <i>ureD</i> , <i>z2098</i> , <i>z2099</i> e <i>z2121</i> .....	<b>52</b>
<b>Tabela 8.</b> Primers e sondas utilizadas na PCR em tempo real para pesquisa das sequências CRISPR C, D e E.....	<b>53</b>
<b>Tabela 9.</b> Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificação de regiões internas dos genes <i>adk</i> , <i>fumC</i> , <i>gyrB</i> , <i>icd</i> , <i>mdh</i> , <i>purA</i> e <i>recA</i> .....	<b>60</b>
<b>Tabela 10.</b> Frequência dos patótipos aEPEC e STEC do sorotipo O26:H11.....	<b>61</b>
<b>Tabela 11.</b> Tipagem pelo sequenciamento MLST e perfil de virulência das cepas de aEPEC e STEC do sorotipo O26:H11.....	<b>75</b>
<b>Tabela 12.</b> Perfis alélicos para os genes <i>adk</i> , <i>fumC</i> , <i>icd</i> , <i>mdh</i> , <i>purA</i> e <i>recA</i> em cepas STEC e aEPEC O26:H11 sem definição de ST de acordo com o banco de dados Enterobase.....	<b>76</b>

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	<b>19</b>
1.1 Generalidades sobre <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	20
1.3 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	20
1.4 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	25
1.5 STEC e EPEC pertencentes ao sorotipo O26:H11.....	30
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>34</b>
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>36</b>
3.1 Amostras bacterianas.....	36
3.2 Meios de cultura e soluções.....	37
3.3 Pesquisa da expressão dos genes <i>stx</i> em cepas de STEC O26:H11 utilizando células Vero.....	37
3.4 Pesquisa da produção da enterohemolisina de EHEC (Ehx).....	39
3.5 Extração de DNA.....	40
3.6 Ensaios de PCR convencional (end point PCR).....	40
3.7 Ensaios de PCR em tempo real (qRT-PCR) para pesquisa dos genes <i>Z2098</i> , <i>Z2099</i> , <i>Z2121</i> , <i>espK</i> , <i>espN</i> , <i>espM1</i> , <i>espV</i> e <i>ureD</i> .....	47
3.7.1 Estabelecimento dos controles positivo e negativo.....	47
3.7.2 Determinação do limite mínimo de detecção dos genes alvo nas cepas estabelecidas como controle positivo.....	47
3.7.3 Pesquisa dos genes-alvo nas cepas em estudo.....	49
3.8 Pesquisa das Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR).....	52
3.9 Tipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	53
3.9.1 Extração do DNA genômico.....	53
3.9.2 Digestão enzimática.....	55
3.9.3 Corrida eletroforética.....	55
3.9.4 Análise dos padrões de macrorestrição.....	56



<b>3.10</b>	<b>Tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos (MLST).....</b>	<b>56</b>
<b>3.10.1</b>	<b>Purificação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG) a 20% em solução de Cloreto de sódio (NaCl) 2,5M.....</b>	<b>57</b>
<b>3.10.2</b>	<b>Protocolo Big Dye®.....</b>	<b>57</b>
<b>3.10.3</b>	<b>Purificação dos produtos de sequenciamento com Etanol Acetato de Sódio (NaOAc/ETOH) .....</b>	<b>58</b>
<b>3.10.4</b>	<b>Análise dos produtos gerados no sequenciamento .....</b>	<b>59</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Patotipos diarreiogênicos identificados nas cepas <i>E. coli</i> O26:H11.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Subtipagem dos genes <i>stx</i> presentes nas cepas STEC O26:H1.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Subtipagem do gene <i>eae</i> nas cepas STEC e aEPEC O26:H1.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Pesquisa de sequências genéticas associadas a mecanismos de virulência diversos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Ocorrência de sequências genéticas associadas aos genes <i>escN</i>, <i>ehx</i>, <i>espP</i>, <i>katP</i>, <i>toxB</i>, <i>etpD</i>, <i>iha</i>, <i>cdt-V</i> e <i>astA</i> presentes em elementos genéticos diversos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Ocorrência dos genes <i>efa-1</i>, <i>nleB</i>, <i>nleE</i>, <i>sen</i> e <i>pagC</i> associados à ilha genômica OI-122.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Ocorrência de genes associados às ilhas genômicas OI-57 (<i>Z2098</i>, <i>Z2099</i>, <i>Z2121</i>), OI-48 (<i>ureD</i>), OI-44 (<i>espV</i>), OI-50 (<i>espK</i>, <i>espN</i>) e OI-71 (<i>espM1</i>).....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Perfis de virulência.....</b>	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>Pesquisa de sequências CRISPR.....</b>	<b>70</b>
<b>4.6</b>	<b>Tipagem por eletroforese de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE).....</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos – <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....</b>	<b>74</b>
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>92</b>
	<b>Anexo I</b>	
	<b>Anexo II</b>	

## 1. Introdução

### 1.1 Generalidades sobre *Escherichia coli* (*E.coli*)

Embora a bactéria *E. coli* tenha sido descrita no ano de 1885 por Theodor *Escherich*, somente em 1940 este microrganismo foi associado à doença diarreica em humanos, através dos relatos de Bray sobre o isolamento do *Bacterium coli neapolitanum* das fezes de crianças inglesas com diarreia (Bray et al., 1945).

*E. coli*, que pertence à família *Enterobacteriaceae*, é a principal espécie do gênero *Escherichia*, consistindo de bacilos Gram negativos fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos e em sua maioria móveis por flagelos peritríqueos (Win et al., 2008). Outras características como a capacidade de produzir indol e de descarboxilar o aminoácido lisina podem também estar presentes, na maioria das cepas de *E. coli*.

Nas primeiras horas, logo após o nascimento, *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal dos neonatos, geralmente durante o primeiro episódio de amamentação. É esperado que a partir deste evento a bactéria permaneça no organismo do hospedeiro por toda a vida, estabelecendo com este uma relação de comensalismo, tomando-se o principal anaeróbio facultativo intestinal. Esta condição não irá se alterar, a menos que haja o rompimento das barreiras de defesa do intestino e a bactéria possa atingir outros sítios anatômicos (Nataro & Kaper, 1998).

Através da aquisição de genes de virulência, por mecanismos de transferência horizontal como conjugação, transformação e transdução fágica, alguns clones comensais de *E. coli* podem se tornar patogênicos (Dobrindt et al., 2010). Nestes casos, tais clones serão capazes de causar doenças tanto no trato gastrointestinal (gastroenterites) como em sítios extra-intestinais (Kaper et al., 2004). Os clones de *E. coli* associados às doenças no trato gastrointestinal são denominados **diarreiogênicos**.

## 1.2 *Escherichia coli* diarreiogênica

As *E. coli* diarreiogênicas são classificadas em tipos patogênicos ou **patotipos** distintos. Esta classificação baseia-se principalmente em propriedades específicas de virulência, mas pode levar em conta também outros critérios como a constituição antigênica, quadros clínicos e características epidemiológicas associadas aos hospedeiros.

Atualmente são reconhecidos seis patotipos de *E. coli* diarreiogênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Croxen et al., 2013). As EPEC e STEC destacam-se dentre estes patotipos, pois a primeira é o agente mais comum de diarreias infantis (Ochoa et al., 2011), e a segunda, além de causar doenças entéricas pode causar também a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), uma grave condição clínica que pode ser fatal em alguns casos (Kaper et al., 2004; Nguyen et al., 2005).

## 1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

O termo EPEC foi introduzido por Neter e colaboradores (Neter et al., 1955) nos anos 50 em alusão ao *Bacterium coli neapolitanum*, que na década anterior havia sido associado a quadros de diarreia infantil, extremamente comuns na Inglaterra durante o período de verão. De fato, as EPEC são desde aquele período até os dias atuais consideradas uma das mais importantes causas de diarreia em crianças com até dois anos (Robins-Browne & Hartland, 2002).

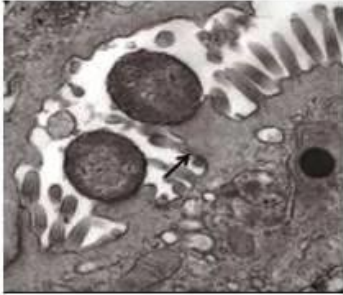
Conforme será discutido adiante este patotipo subdivide-se em cepas típicas e atípicas, estando as últimas atualmente relacionadas também à diarreia em outras faixas etárias como adultos jovens, além de crianças.

EPEC tem como principal propriedade de virulência a capacidade de causar uma lesão histológica na mucosa do intestino delgado do hospedeiro denominada “*attaching and effacing*” (A/E). A lesão A/E faz com que ocorra no interior do enterócito, a célula funcional do intestino, um rearranjo de proteínas do citoesqueleto celular em função da adesão e emissão de sinais químicos por parte da bactéria. Conforme

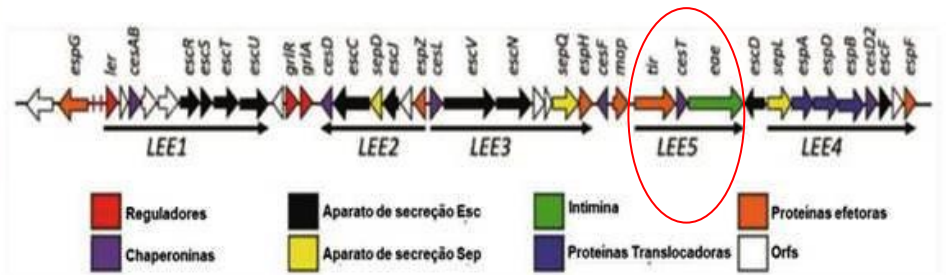
demonstrado na figura 1A em nível histológico as vilosidades intestinais perdem a sua conformação fisiológica e adquirem o formato de estruturas semelhantes a pedestais (Moon et al., 1983; Knutton et al., 1989). Como consequência, o processo de absorção de nutrientes e funcionamento da mucosa como um todo é prejudicado, levando ao quadro de diarreia.

A lesão A/E ocorre pela atuação de diversas proteínas produzidas por genes localizados no cromossomo bacteriano, em um locus genético denominado *Locus of Enterocyte Effacement (LEE)* (MacDaniel et al., 1995). Dentre os mais de 40 genes que compõem o locus *LEE* (figura 1B), organizados em cinco operons policistrônicos (Elliot et al., 1998), destaca-se o gene *eae* responsável pela produção de uma proteína de membrana externa denominada intimina, que é fundamental no estabelecimento da lesão A/E, pois promove a adesão da bactéria ao enterócito. Entretanto, outro gene, o gene *tir*, é também de grande importância no processo, sendo responsável pela produção da proteína Tir, que atua como receptor para a intimina na célula hospedeira. Uma vez que a célula hospedeira não apresenta um receptor específico para a intimina, Tir que é produzido pela própria bactéria, é introduzido na célula através de um sistema de secreção bacteriano do tipo III, permitindo desta forma a ligação da intimina (Kenny et al., 1997; Dean et al., 2005).

A



B



Fonte: Modificado de Wong *et al.* (2011).

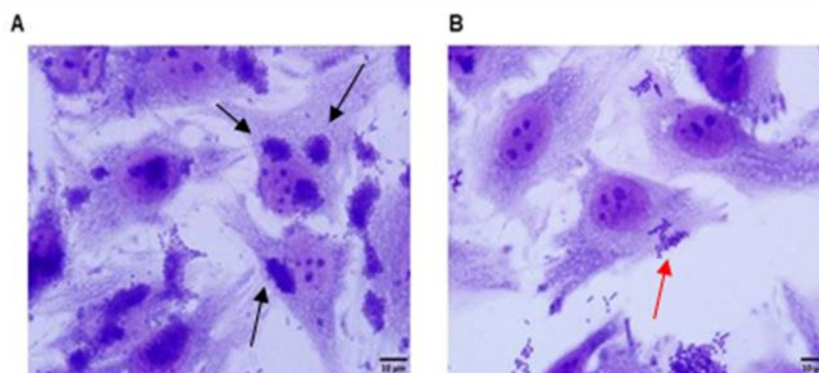
**Figura 1.** Lesão histológica induzida por EPEC e organização genética do Locus *LEE*. Em A, microscopia eletrônica de transmissão mostrando o aspecto de pedestal (seta) induzido pelo contato bacteriano com célula intestinal. Ao lado do pedestal vilosidades intestinais ainda sem alterações morfológicas. Em B, as cinco regiões que compõem o Locus *LEE* da cepa protótipo de EPEC E2348/69, com destaque para a região *LEE 5* (círculo) onde estão contidos os genes *eae* e *tir*.

O desenvolvimento completo da lesão *AE* ocorre em três etapas: adesão inicial, transdução de sinal e fixação/adesão íntima com formação do pedestal (Garmendia *et al.*, 2005). Na etapa de adesão inicial há a participação de uma fímbria do tipo IV denominada *Bundle Forming Pillus* (Bfp); A fímbria Bfp é produto da transcrição de um conjunto de 14 genes localizados no operon *bfp*, sendo este carregado por um plasmídeo de aproximadamente 60 mDA denominado pEAF (*EPEC adherence factor*) (Donnenberg *et al.*, 1992). A atuação de Bfp faz com que as bactérias, além de se ligarem às células hospedeiras, unam-se umas as outras, de modo a formar uma estrutura compacta, também denominada de *cluster* bacteriano (figura 2).

Diversos estudos demonstraram que o plasmídeo pEAF não está presente em todas as cepas de EPEC, o que significa que muitas delas não são capazes de expressar Bfp e formar os clusters bacterianos. Estudos *in vitro* de interação bactérias-células eucariontes, empregando cultivos de células HeLa, demonstraram que é possível visualizar na superfície celular a formação dos clusters bacterianos de cepas de EPECs portadoras de Bfp. Este fenômeno é conhecido como adesão localizada (AL). Por outro lado, nas EPEC desprovidas de Bfp, onde não há a formação dos clusters a interação é denominada de adesão localizada-like (ALL).

Com base nestes fatos relacionados à presença ou ausência da fímbria

Bfp, no ano de 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, ocorrido na cidade de São Paulo foi proposta a divisão do patotipo EPEC em dois subgrupos, as EPEC típicas (tEPEC) e as EPEC atípicas (aEPEC) (Hernandes et al., 2009). De acordo com essa classificação as tEPEC seriam aquelas portadoras de Bfp e capazes de expressar o fenótipo de AL. O termo aEPEC designa as cepas de EPEC desprovidas de Bfp e que expressam o fenótipo ALL. Posteriormente estas definições foram revistas e passaram a considerar também que na definição das aEPEC além da ausência do gene *bfp*, o gene *stx*, que define o patotipo STEC (a ser discutido adiante), deve estar ausente. Isto se fez necessário, pois muitas cepas STEC também podem apresentar o gene *eae*.



Fonte: Hernandes et al. (2009).

**Figura 2.** Padrões de adesão às células HeLa cultivadas *in vitro* expressos por cepas de EPEC. Em A, adesão localizada (AL), característica das tEPEC portadoras do gene *bfp*, que promove a conexão inter-bactérias provocando uma forte compactação destas e a formação de grumos ou clusters (setas pretas) bacterianos. Em B, o fenótipo de adesão localizada-like (ALL) com o aspecto mais “frouxo” dos grumos de bactérias (seta vermelha), denotando a ausência de *bfp*, o que caracteriza as aEPEC.

A EPEC é uma causa significativa de gastroenterites que têm como manifestações clínicas além da diarreia, febre e vômito, e pode levar crianças menores de dois anos à desidratação e desnutrição (Nataro & Kaper, 1998; Goosney et al., 2000; Nair et al., 2010). Na maioria dos casos a diarreia é autolimitada e pode ser tratada com reidratação oral, sendo a forma aguda de diarreia o tipo mais comum de manifestação, embora já tenham sido relatados casos de diarreia persistente, com duração superior a duas semanas (Fagundes et al., 1996; Nguyen et al., 2006; Park et al., 2014).

A transmissão de EPEC ocorre pela via fecal-oral, devido à contaminação da água e dos alimentos contendo a bactéria. As EPEC já foram encontradas em alimentos crus e processados, assim como em ambientes aquáticos e terrestres como água, solo, areia de praia, solo de abatedouro bovino e fazendas (Ibenyassine et al., 2006; Vidal et al., 2007; Silva et al., 2010; Verhaegen et al., 2016).

Existem diferenças epidemiológicas entre as aEPEC e as tEPEC, pois as tEPEC são observadas com um comportamento epidemiológico quase restrito aos humanos (Morato et al., 2009; Moura, et al., 2009; Silva et al., 2010), enquanto que as aEPEC podem ser encontradas infectando tanto humanos quanto animais (Brandal et al., 2012; Moura et al., 2009). As gastroenterites por tEPEC decrescem com a idade sendo mais raras em adultos e crianças com mais de cinco anos, isso porque ocorre o desenvolvimento da imunidade com o avanço da idade (Nataro & Kaper, 1998).

Durante muitos anos EPEC foi considerada um importante agente de diarreia infantil nos países desenvolvidos (Trabulsi et al., 2002; Afset et al., 2004), sendo mais rara em países em desenvolvimento. Entretanto nas últimas décadas os estudos mostraram que a incidência da infecção por aEPEC foi maior do que tEPEC, principalmente em países em desenvolvimento (Hernandes et al., 2009).

Diversos estudos demonstraram que as aEPEC foram o grupo de bactérias diarreio gênicas mais prevalente em casos de diarreia acometendo crianças e adultos em diversas regiões geográficas (Gomes et al., 2004; Cohen et al., 2005; Foster et al., 2015; Dias et al., 2016). A ocorrência de surtos causados por aEPEC tem sido reportada em diversas partes do mundo (Afset et al., 2003, 2004; Bueris et al., 2007; Shetty et al., 2012).

No Brasil aEPEC é considerada um dos enteropatógenos mais isolados nos casos de diarreia; um estudo realizado em crianças menores de cinco anos na região metropolitana de São Paulo, entre os anos de 2015 e 2016, identificou aEPEC como agente etiológico em 49% dos casos analisados (BEPA, 2019). Em outro estudo conduzido pelo Instituto Adolfo Lutz com amostras de casos de diarreia de diversas regiões do Brasil, no período de 2011 a 2016, as aEPEC também foram o enteropatógeno mais frequente com isolamento em 52,6% dos pacientes analisados (Ori et al., 2019).

#### 1.4 *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

STEC compreende o grupo de cepas de *E. coli* diarreio gênica cuja capacidade de causar doenças está relacionada a produção de citotoxinas denominadas toxinas de Shiga (Stx). A descoberta das STEC segue os seguintes fatos: em 1977 Konowalchuk et al. descreveram a morte de células Vero cultivadas *in vitro* pela ação de uma exotoxina letal produzida por cepas de *E. coli* associadas a casos graves de diarreia. Em 1982 O'Brien et al. ao testarem em células HeLa sobrenadantes de cultura provenientes de cepas de *E. coli* associadas a casos graves de diarreia, observaram um efeito citotóxico semelhante àquele reportado por Konowalchuk. Entretanto, estes autores observaram também que este efeito podia ser parcialmente abolido pelo tratamento dos sobrenadantes com antissoros produzidos contra a toxina Stx de *Shigella dysenteriae* sorotipo I. Em 1983, Ryley et al. relataram o isolamento de um sorotipo de *E. coli*, o O157:H7, isolado das fezes de pacientes com uma forma exacerbada de diarreia, caracterizada por grandes lesões da mucosa intestinal e fezes sanguinolentas, esta manifestação clínica foi denominada colite hemorrágica (CH). Este mesmo sorotipo também foi associado com uma síndrome denominada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) que tem como manifestações clínicas a insuficiência renal, anemia hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica. Nestes estudos observou-se que as cepas bacterianas eram capazes de produzir a mesma toxina anteriormente descrita por Konowalchuk e O'Brien (Karmali et al., 1985).

Os fatos relatados no parágrafo anterior corroboraram para o estabelecimento do critério atual de classificação das STEC que é a presença do gene *stx*, independentemente da sua expressão fenotípica. Posteriormente, um subgrupo das STEC denominado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi descrito; cepas com esta denominação além de possuírem o gene *stx*, apresentam também o gene *eae*, o que as torna mais patogênicas e capazes de causar doenças mais severas. Este grupo tem sido associado com maior frequência à colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (Tarr et al., 2005c; Mellmann et al., 2009; Luna- Gierke et al., 2014).



As toxinas Stx possuem três propriedades biológicas lesivas ao hospedeiro humano: enterotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Melton-Celsa, 2014). Em nível molecular atuam interrompendo a tradução eucariótica através da remoção de uma base de adenina da subunidade ribossomal 60S, induzindo a morte celular por apoptose. Todas as toxinas Stx seguem o modelo estrutural AB<sub>5</sub> no qual uma subunidade A cataliticamente ativa liga-se a um pentâmero de subunidades B (Endo et al., 1988; Saxena et al., 1989; Tesh et al., 2010).

As toxinas Stx de STEC dividem-se em dois tipos antigênicos principais Stx1 e Stx2, os quais ainda possuem subtipos. Uma dada cepa de STEC pode produzir um tipo ou outro de Stx, ou ainda os dois tipos concomitantemente. Stx1 apresenta os subtipos 1a, 1c e 1d, enquanto Stx2 possui atualmente dez subtipos a, b, c, d, e, f, g, h, i e k (Lacher et al., 2016; Bai et al. 2018; Hughes et al., 2020). A subtipagem de *stx* não é somente útil para a classificação das STECs, mas também como critério de evolução clínica, pois alguns subtipos como *stx2a*, *stx2c* e *stx2d* têm sido associados com desfechos clínicos mais graves como a SHU (Friedrich et al., 2002; Persson et al., 2007).

As manifestações clínicas associadas ao patótipo STEC vão desde formas brandas de diarreia até quadros clínicos severos incluindo a colite hemorrágica. Entretanto, a forma clínica mais grave e preocupante é a SHU (Tarr et al., 2005). Esta síndrome ocorre em cerca de cinco a 10% dos indivíduos infectados por STEC, e é caracterizada como uma forma de microangiopatia trombótica, que leva a uma tríade de sintomas que englobam a anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal podendo ser fatal (Fakhouri et al., 2017). É a principal causa de falência renal aguda infantil (Bruyand et al., 2019).

O mecanismo principal na patogênese da SHU é a atuação das toxinas Stx sobre o endotélio vascular causando lesão endotelial, principalmente nas células renais, ricas em receptores dos tipos GB3 (globotriosilceramida) e GB4 (globotetraosilceramida), que são ligantes específicos para Stx, entretanto, células endoteliais de outros órgãos como o cérebro, e menos frequentemente o coração também podem ser afetadas por apresentarem, ainda que em menor quantidade os mesmos receptores (Hurley et al., 1999).

STEC é o único dos patótipos diarréiogênicos de *E. coli* com origem comprovadamente zoonótica, pois estas bactérias podem ser encontradas em animais ruminantes, sendo o gado o seu principal reservatório natural. Desta forma, a mais importante via de transmissão das STEC para o homem se pela ingestão de alimentos contaminados, sendo o leite e a carne os principais veículos envolvidos. A transmissão direta do animal para o homem é menos frequente, mas também pode ocorrer (Caprioli et al., 2014). Existem outras formas de transmissão possíveis já que esta bactéria pode ser excretada nas fezes dos animais e contaminar águas de superfície ou subterrâneas, o solo, bem como culturas de hortifrutigranjeiros. (Caprioli et al., 2005; Rivas et al., 2008).

As STEC podem apresentar além da toxina Shiga outros fatores de virulência, e muitos destes fatores são produzidos por genes associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos de alta massa molecular e ilhas de patogenicidade. Conforme mencionado anteriormente o gene *eae*, produzido pelo locus *LEE*, pode estar presente em uma proporção de cepas STEC.

Em relação aos plasmídeos associados à virulência, um dos mais bem caracterizados é o pO157, descrito na cepa de referência EDL 933 do sorotipo O157:H7. Os genes deste plasmídeo codificam vários marcadores de virulência, tais como a enterohemolisina (*Ehx*), a enzima catalase peroxidase (*KatP*), uma serino-protease (*EspP*), uma proteína efetora associada a um sistema de secreção tipo II (*EtpD*) e uma proteína responsável pelo aumento da adesão bacteriana a células cultivadas *in vitro* (*ToxB*) (Beutin et al., 1989; Schmidt et al., 1995).

O gene *ehxA* associado a enterohemolisina pode ser considerado um marcador de alta virulência, pois tem sido associado em maior frequência a cepas de STEC isoladas de indivíduos com quadros clínicos graves e SHU (Beutin et al., 1989). A *Ehx* promove a destruição de hemácias através da formação de poros na membrana plasmática, e como consequência ocorre a liberação de ferro que é um elemento importante para o metabolismo bacteriano (Mainil, 2013).

O gene *katP* codifica uma proteína com dupla atividade, tanto de catalase como de peroxidase; esta é utilizada pela bactéria para neutralizar o efeito nocivo de moléculas reativas de oxigênio que são liberadas pelos fagócitos do hospedeiro durante a infecção. *KatP* também promove o aumento da capacidade

da bactéria em colonizar o intestino na ausência de oxigênio (Brunder et al., 1996; Uhlich, 2009).

O gene *espP* codifica uma serino-protease que faz parte do grupo das proteínas autotransportadoras de enterobactérias. Esta protease é responsável por clivar o fator V da coagulação, um componente crítico do processo de coagulação, e consequentemente ocorre uma exacerbação da SHU, e intensificação da hemorragia intestinal (Dziva et al., 2007).

A proteína ToxB também foi considerada um fator de virulência adicional das STEC uma vez que sua presença aumenta a capacidade de adesão a cultivos celulares das cepas que a expressam. Além disso, a ocorrência do gene *toxB* foi associada a quadros clínicos mais severos nas infecções por STEC (Tatsuno et al., 2001).

Diversas ilhas de patogenicidade são encontradas em cepas de STEC associadas a infecções humanas. Ilhas de patogenicidade representam segmentos do genoma bacteriano cujo tamanho pode variar de 10.000 a 200.000 pares de bases. Possuem características distintas do restante do genoma, já que são formadas quase exclusivamente por genes associados à produção de fatores de virulência e outros genes que codificam moléculas necessárias para que estes fatores possam atingir uma célula-alvo no hospedeiro (Vieira, 2009). Exemplos de ilhas de patogenicidade associadas a clones altamente virulentos de STEC incluem as ilhas OI-122, OI-43, OI-48, OI-57 e OI-71.

Bugarel et al. (2011b) investigaram a ocorrência de genes das ilhas OI-122, OI-57 e OI-71 em cepas de *E. coli* diarreiogênicas e observaram que estes genes foram mais associados ao patotipo STEC/EHEC. A ilha OI-122, uma das mais estudadas em *E. coli* diarreiogênicas contém genes como: *efa-1*, *sen*, *pagC*, *nleB* e *nleE* (Vieira et al., 2010). O gene *efa-1* é denominado fator de adesão de EHEC e tem sido associado à adesão destas bactérias a células epiteliais e à inibição da proliferação de linfócitos no sangue periférico (Karmali et al., 2003). O gene *sen* codifica uma toxina que tem similaridade com a enterotoxina 2 de *Shigella flexneri* (Karmali et al., 2003; Konczyk et al., 2008). O gene *pagC* codifica uma proteína de membrana externa que permite a sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos; este gene também pode ser encontrado em *Salmonella Typhimurium*

(Nishio et al., 2005). Os genes *nleB* e *nleE* interferem em vias de sinalização inflamatórias, impedindo o desenvolvimento da resposta imunológica do hospedeiro para eliminação bacteriana (Nadler et al., 2010).

As ilhas OI-43/OI-48 estão presentes em amostras de STEC/EHEC O157:H7 e outras STECs e contêm genes como *iha* (adesina homóloga a *irgA*), responsável pela produção de uma adesina (Schmidt et al., 2001) e *ureD* (urease D) um dos responsáveis por codificar a enzima urease, que atua sobre a ureia degradando-a em amônia, conseqüentemente elevando o pH e favorecendo a sobrevivência bacteriana em ambientes ácidos, além de prover uma fonte de nitrogênio (Mobley et al., 1995). O gene *terE* (resistência ao telurito) também presente na OI-43/OI-48 confere à bactéria que o produz a capacidade de resistência ao telurito (Taylor et al., 2002), sendo um importante fator de aumento da sobrevivência e persistência bacteriana.

Outras toxinas, além da toxina Shiga podem estar presentes em amostras de STEC. Exemplos incluem a toxina citoletal distensora (CDT), uma ciclomodulina que é produzida por diversas bactérias Gram negativas, incluindo as *E.coli*, e cepas de STEC. CDT causa o bloqueio do ciclo celular eucariótico na fase de transição G2/M levando a morte celular. Morfologicamente as células expostas a CDT apresentam-se alongadas e distendidas em função do acúmulo de material genético no núcleo por não ocorrer a mitose celular. Em *E. coli* já foram reportados cinco alelos do gene responsável pela produção de CDT, com base na sequência de aminoácidos das respectivas proteínas expressas (Hinenoya et al., 2017). O alelo *cdt-V* é característico de STEC e foi descrito em amostras de STEC O157:NM, O157:H7 e não-O157 (Janka et al., 2003).

As STECs estão associadas a mais de 400 sorotipos (Beutin et al., 2009), entretanto somente alguns destes sorotipos são capazes de causar doenças humanas. O sorogrupo mais importante de STEC do ponto de vista clínico e epidemiológico é o O157. Este é altamente prevalente em países como os EUA e Japão, além de ser o mais associado aos casos graves de infecção humana com evolução para colite hemorrágica e SHU (Henaio et al., 2015; Kanayama et al., 2015). Entretanto, os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145, também denominados de “*big six*” possuem atualmente uma importância clínica e epidemiológica comparável ao sorogrupo O157. Estes sorogrupos, que apresentam

praticamente os mesmos fatores de virulência das STEC O157:H7 podem causar doenças com severidade clínica comparável a estas.

Diversos estudos realizados com o intuito de caracterizar isolados de EPEC e STEC demonstraram que estes dois patótipos apresentam profundas relações filogenéticas. Evidências demonstraram que o sorotipo O157:H7 de STEC representa um clone de EPEC do sorotipo O55:H7 que ao evoluir adquiriu os genes *stx* através de transdução fágica, uma vez estes genes estão presentes no genoma de bacteriófagos do tipo lambda (Feng et al., 2007). Entretanto, da mesma forma que determinados clones de *E.coli* apresentam a habilidade de adquirir *stx*, a perda destes genes é um evento comum e relativamente frequente em cepas de determinados sorogrupos e sorotipos de STEC como o sorotipo O26:H11 (Bielaszewska et al., 2007b).

### **1.5 STEC e EPEC pertencentes ao sorotipo O26:H11**

As *E.coli* O26:H11 podem ser classificadas como STEC ou EPEC, em função da presença do gene *stx* no primeiro caso e do gene *eae* no segundo caso. Entretanto, cepas STEC O26:H11 em sua quase totalidade também albergam o gene *eae* (Tabela 1) estando, portanto, este sorotipo incluso no subgrupo das STEC/EHEC. O sorotipo O26:H11 quer seja como STEC/EHEC quer seja como EPEC, é um dos mais comumente associados a infecções entéricas humanas. No continente europeu as STEC O26:H11 representam importante causa de doenças graves em diversos países (Brooks et al., 2005), especialmente na França e na Alemanha, onde figuram como o principal sorotipo não-O157 associado a SHU. No Brasil, o primeiro relato de SHU confirmado com critério laboratorial e descrito na literatura foi atribuído a um isolado de STEC O26:H11 (Guth et al., 2002).

**Tabela 1.** Classificação dos patótipos STEC e EPEC isolados de amostras clínicas com base na ocorrência dos genes *stx*, *eae* e *bfp*

Marcador genético	PATÓTIPO		
	STEC	EPEC	
		Típica	Atípica
<i>stx1/2</i>	+	-	-
<i>eae</i>	+/-	+	+
<i>bfp</i>	-*	+	-

\*Há raros relatos na literatura sobre a ocorrência de cepas STEC de origem animal Bfp+

Estudos comparando cepas de STEC e aEPEC O26:H11 verificaram que em muitos destes isolados o perfil de genes associados a mecanismos de virulência é bastante semelhante, sugerindo que as cepas O26:H11 de aEPEC poderiam representar na verdade isolados de STEC que sofreram a perda dos genes *stx*, uma vez que a ausência deste gene foi a única diferença observada dentre as aEPEC e STEC analisadas (Bielaszewska et al., 2007a).

Deste modo, surgiu a hipótese de que muitas cepas laboratorialmente identificadas como aEPEC O26:H11 por apresentarem o gene *eae* representam cepas de STEC que perderam o gene *stx* por excisão fágica, retendo em seu genoma o marcador *eae*. Evidências já demonstram que as STEC O26:H11 são bactérias dinâmicas do ponto de vista genético, que podem sofrer rearranjos constantemente, levando-as a perda ou ganho de material genético, com o intuito de torná-las altamente adaptáveis e com capacidade de disseminação global (Bielaszewska et al., 2007c).

A incorreta identificação de cepas de EPEC e STEC tem implicações importantes: do ponto de vista clínico impede que pacientes infectados por clones de STEC, que podem causar doenças graves, possam ser adequadamente acompanhados se houver destes pacientes o isolamento de cepas equivocadamente classificadas como aEPEC, as quais não causam normalmente doenças graves. Cria-se uma situação de subdiagnóstico das infecções por STEC levando concomitantemente a estimativas equivocadas sobre a ocorrência de cepas de aEPEC, o que impede a adequada vigilância da circulação e compreensão da epidemiologia destes patógenos.

Em função da problemática associada à identificação de cepas de aEPEC e STEC O26:H11, a busca por novos marcadores genéticos que possibilitem a

correta diferenciação das aEPEC verdadeiramente associadas ao patotipo EPEC daquelas relacionadas ao patotipo STEC, ou seja, que perderam os genes *stx*, tomou-se uma das principais demandas das pesquisas envolvendo as *E.coli* diarreio gênicas. Assim, recentemente, alguns estudos identificaram sequências genéticas que se revelaram promissoras como alvos para tal finalidade. Em particular, os genes *Z2098*, *Z2099*, *Z2121* relacionados à ilha genômica OI-57, o gene *etpD*, e os genes *espK*, *espM1*, *espN* e *espV* cuja ocorrência foi demonstrada em alta frequência em cepas de STEC e de aEPEC O26:H11 altamente suspeitas de serem derivadas de clones STEC, foram propostos como alternativas (Delannoy et al., 2013, 2016; Piazza et al., 2013).

A pesquisa das chamadas *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) ou repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespçadas, que representam pequenas sequências palindrômicas de DNA agrupadas e adjacentes a regiões denominadas *spacers* (separadoras), têm sido proposta como uma das técnicas moleculares mais específicas e discriminatórias atualmente disponíveis para identificação de cepas de STEC e aEPEC derivadas de STEC. Em um estudo conduzido na França, a análise da presença de sequências CRISPR características de STEC O26:H11 revelou uma especificidade de 98% na capacidade da técnica de discriminar as aEPEC que sofreram a perda do gene *stx* daquelas que nunca albergaram este gene, ou seja, que são verdadeiramente EPEC (Delannoy et al., 2012). Em outro estudo, a combinação da pesquisa das sequências CRISPR específicas para o sorotipo O26:H11 (CRISPR<sub>O26:H11</sub>) com os genes *Z2098*, *espK* e *espV*, demonstrou ser uma estratégia altamente sensível e específica para a identificação de cepas de STEC O26:H11 de amostras de alimentos cárneos (Delannoy et al., 2016).

Embora alguns estudos analisando a ocorrência de genes para a produção de fatores de virulência como toxinas, adesinas e proteínas autotransportadoras já tenham sido realizados em cepas de aEPEC de sorotipos diversos, incluindo o sorotipo O26:H11, isoladas em nosso meio, tais estudos envolveram coleções de cepas antigas e de regiões geográficas restritas, fatos estes que limitam a análise da importância dos resultados obtidos num contexto mais amplo e atual (Cergole-Novella et al., 2007; Hernandes et al., 2009 ; Vieira et al., 2016). Além disso, uma análise comparativa entre as STEC e aEPEC O26:H11 isoladas a partir

das atividades de vigilância laboratorial como as que o Instituto Adolfo Lutz desempenha ainda não foi realizada. No mais, exceto pelo estudo conduzido por Vaz et al no ano de 2006 (Vaz et al., 2006), estudos no Brasil descrevendo a diversidade genética, envolvendo especificamente cepas de STEC e aEPEC O26:H11, não existem. Até o presente momento nenhum estudo empregou ferramentas como a tipagem pelo sequenciamento de lócus múltiplos (*Multi Locus Sequence Typing-MLST*) a fim de analisar a diversidade clonal e filogenética de cepas do sorotipo O26:H11 isoladas no Brasil.

Tais deficiências no conhecimento sobre as STEC e aEPEC O26:H11 circulando em nosso meio podem ser consideradas barreiras para o avanço no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico destes dois patótipos, e limitam as possibilidades de vigilância epidemiológica.

Sendo assim, este estudo foi proposto com o objetivo maior de contribuir para que novas alternativas de marcadores genéticos potencialmente úteis para a melhoria no diagnóstico laboratorial e vigilância das cepas de STEC e aEPEC O26:H11 possam se tornar disponíveis, e para avaliar a diversidade genética das cepas STEC e aEPEC do sorotipo O26:H11 isoladas no Brasil.



## 2. Objetivo

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença de genes relacionados a mecanismos de virulência e de novos genes associados a diferentes ilhas genômicas, potencialmente úteis para a discriminação e correta identificação de cepas de *Escherichia coli* do sorotipo O26:H11 pertencentes aos patotipos STEC e aEPEC. Avaliar a diversidade genética e o background filogenético de cepas STEC e aEPEC O26:H11.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1- Realizar a subtipagem do gene *stx* nas cepas STEC O26:H11;
- 2- Realizar a pesquisa da expressão dos genes *stx* nas cepas STEC O26:H11;
- 3- Realizar a subtipagem do gene *eae* nas cepas STEC e aEPEC O26:H11;
- 4- Pesquisar a ocorrência de genes relacionados a diversos mecanismos de virulência já descritos em cepas dos patotipos STEC e aEPEC O26:H11;
- 5- Realizar a pesquisa da expressão do fenótipo enterohemolítico nas cepas STEC e aEPEC O26:H11 portadoras do gene *ehx*;
- 6- Pesquisar a ocorrência dos genes *Z2098*, *Z2099*, *Z2121* (ilha genômica OI-57), *espK* (ilha genômica OI-50), *espM1* (ilha OI-71), *espN* (ilha genômica OI-50), *espV* (ilha genômica OI-44), *ureD* (ilhas genômicas OI-43/OI-48) e *terE* (ilhas genômica OI-43/OI-48) nas cepas STEC e aEPEC O26:H11;
- 7- Pesquisar a ocorrência das sequências CRISPR<sub>O26:H11</sub> dos tipos C, D e E nas cepas STEC e aEPEC O26:H11;

**8-** Avaliar a diversidade genética das cepas das cepas STEC e aEPEC O26:H11 por eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – *PFGE*);

**9-** Realizar a tipagem das cepas STEC e aEPEC O26:H11 pela técnica de Sequenciamento de Locus Múltiplos (Multi Locus Sequence Typing – *MLST*).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Amostras bacterianas

Foram analisadas neste trabalho um total de 48 cepas de *E. coli* O26:H11. Para se chegar a este número, uma triagem inicial envolvendo a pesquisa dos genes *stx*, *eae* e *bfpB* (item 3.6) foi realizada em 100 cepas bacterianas com características bioquímicas compatíveis com *E. coli*. Além da caracterização bioquímica as cepas triadas haviam tido o sorogrupo O26 determinado através de testes de aglutinação em lâmina, uma metodologia amplamente empregada no passado como critério de diagnóstico para as *E. coli* diarréogênicas, mas que por apresentar baixa especificidade em relação à diferenciação de clones patogênicos e comensais teve seu uso descontinuado com o passar dos anos. Após a seleção dos 48 isolados que apresentavam os marcadores genotípicos de interesse uma nova etapa de análises foi realizada, desta vez envolvendo a confirmação da presença dos genes *wzx*<sub>O26</sub> associado a expressão do antígeno somático (sorogrupo) O26, e *flc*<sub>H11</sub>, relacionado a produção da flagelina do tipo H11. As informações relacionadas ao perfil de amplificação dos genes de interesse para caracterização das cepas estudadas como STEC ou aEPEC do sorotipo O26:H11, bem como a origem e ano de isolamento das mesmas constam no Anexo I. Todas as cepas bacterianas analisadas encontravam-se congeladas a - 20°C e/ou liofilizadas, e foram reativadas em 5 mL de caldo TSB e reisoladas em ágar TSA, tendo sido incubadas a 35°C por cerca de 18 a 20 horas. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram realizados a partir da mesma colônia inicialmente isolada após a reativação bacteriana, e apresentando os marcadores genotípicos supramencionados.

### **3.2 Meios de cultura e soluções**

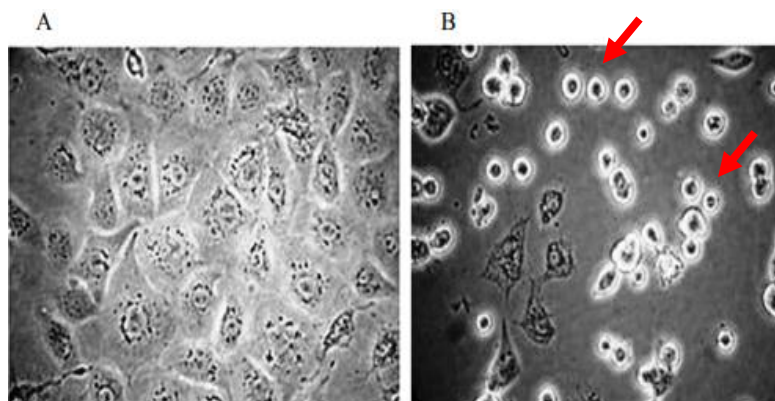
Os meios de cultivo e soluções empregados nos diversos procedimentos descritos neste estudo constam no Anexo II. Exceto quando especificado a procedência de tais meios e soluções foi Oxoid® e Sigma®.

### **3.3 Pesquisa produção de Stx em cepas de STEC O26:H11 utilizando células Vero em cultivo**

A pesquisa da produção de Stx foi realizada através de ensaios de citotoxicidade empregando células Vero cultivadas *in vitro*. As cepas classificadas como STEC foram semeadas em 10 mL de caldo Penassay e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período 1 mL das culturas foi transferido para frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 24 mL do caldo Penassay estéril (Anexo II). Estes frascos foram novamente incubados a 37°C por 24 horas sob agitação (150 rpm). Após a incubação, foram transferidos 1,5 mL das culturas para tubos de polipropileno do tipo Eppendorf estéreis, e estes tubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.200xg sob refrigeração. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos de ensaio estéreis de 12 x 120 mm e filtrados em membranas de 0,22 µm de porosidade. Cerca de 1 mL do filtrado foi transferido para novos tubos do tipo Eppendorf e estes foram imediatamente congelados. O controle de esterilidade dos filtrados foi realizado a partir da transferência de duas gotas deste filtrado para os tubos contendo caldo TSB, e a mesma quantidade para as placas de ágar chocolate; ambos foram incubados 37°C ± por 48 h. Após este período, sendo evidenciada a esterilidade do material procedeu-se ao ensaio de citotoxicidade com as células Vero.

As células Vero utilizadas nos ensaios de citotoxicidade foram cultivadas pelo Núcleo de Cultura de Células do IAL e fornecidas ao Núcleo de Doenças Entéricas em microplacas de polipropileno a uma concentração de 100.000 células/mL. Para realização do ensaio retirou-se de cada poço da microplaca o volume de 200 µL de meio que recobria o tapete celular. Em seguida, 25 µL dos sobrenadantes filtrados de cada uma das cepas O26 a serem testadas e de filtrados que foram preparados nas

mesmas condições, provenientes das cepas EDL933 (controle positivo), K12:H5 (controle negativo) e meio Penassay apenas, foram inoculados em triplicata na microplaca. Estes filtrados ficaram em contato com o tapete celular por aproximadamente 30 minutos e em seguida a cada poço adicionou-se 175  $\mu$ L do meio de cultivo celular. A microplaca foi imediatamente incubada a 37°C em estufa de dióxido de carbono. Para interpretação do ensaio, decorridas 24 horas após a inoculação das células foram feitas leituras diárias por um período de 96 horas para se evidenciar o efeito citotóxico resultante da atividade biológica das toxinas de Shiga, que se caracteriza por arredondamento celular progressivo até o total destacamento das células do substrato sólido e destruição do tapete celular (Figura 3). Observou-se a intensidade de lise promovida pelas cepas em estudo em relação à cepa EDL933 que nas condições de cultivo acima descritas é capaz de promover lise celular total em cerca de 72 horas. O teste foi considerado válido apenas se após o período total de incubação nenhuma alteração morfológica importante além das que são esperadas em função de modificações de pH do meio de cultivo celular tivesse ocorrido nos poços contendo o controle negativo e o filtrado preparado com o meio Penassay não inoculado.



**Figura 3.** Efeito citotóxico sobre células Vero característico da toxina Stx produzida por cepas de STEC. Em A observamos as células Vero intactas, antes da exposição ao sobrenadante de cultura proveniente de uma cepa produtoras de Stx. Em B observa-se o arredondamento celular (setas vermelhas) e a destruição do tapete celular, após 96 horas de incubação (Imagem produzida no Núcleo de Doenças Entéricas do Centro de Bacteriologia – NDEI/CB).

### 3.4 Pesquisa da produção da enterohemolisina de EHEC (Ehx)

Para pesquisa do fenótipo de enterohemolisina foi empregado ágar sangue de carneiro, suplementado com cloreto de cálcio a 1M. Inicialmente fez-se o preparo do ágar base (BAB – Blood Agar Base), segundo as especificações do fabricante. Este meio foi esterilizado por autoclavação e resfriado até a uma temperatura próxima da temperatura ambiente para que a adição do sangue de carneiro e do cloreto de cálcio pudesse então ser feita. Para o preparo do sangue de carneiro este foi submetido a sucessivas lavagens (um total de quatro) com solução salina 0,85% estéril. Neste processo, 20 mL de sangue desfibrinado foi colocado em um tubo de centrifuga estéril com capacidade para 50 mL, ao qual se adicionou 20 mL da solução salina 0,85%. Este material foi centrifugado por 10 minutos a 252-363xg, e a cada etapa de centrifugação realizada o sobrenadante resultante foi desprezado, e em seguida novos 20 mL de solução salina 0,85% eram adicionados. Após a última centrifugação o sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram ressuspensas em 20 mL de salina 0,85%. Após o procedimento de lavagem do sangue, a este se acrescentou 1 mL de cloreto de cálcio 1M, seguindo-se então o preparo das placas, no qual, para um volume total de 100 mL de mistura BAB + sangue lavado, de modo que a concentração final do sangue no meio fosse de 5%, a 95 mL de BAB foi adicionado 5 mL de sangue lavado e suplementado. A mistura foi delicadamente homogeneizada para evitar a lise mecânica das

hemácias, e em seguida distribuída em placas de Petri de 90 x 15 mm (20 mL por placa). As placas foram deixadas à temperatura ambiente para que pudessem solidificar e em seguida incubadas à 37°C para controle de esterilidade.

Para a realização do ensaio de enterohemosina as cepas bacterianas foram cultivadas em ágar TSA (Anexo II). Após o cultivo, uma porção do crescimento bacteriano proveniente de uma colônia isolada foi semeada na placa de ágar sangue de carneiro em forma de 'spot'. A placa foi incubada à 37°C. Foram realizadas duas leituras, uma que ocorreu quatro horas após a semeadura, para verificar a produção de  $\alpha$ -hemolisina, e a outra que ocorreu 24 horas após a semeadura para verificação da produção de  $\beta$ -enterohemolisina. Estes ensaios foram realizados apenas nas cepas portadoras da sequência genética *ehxA* previamente investigada por PCR conforme será descrito no item 3.6.

### 3.5 Extração de DNA

O DNA bacteriano total empregado em todos os procedimentos moleculares, exceto nos ensaios de PFGE, foi obtido através da técnica de lise térmica. Para tanto, uma pequena alçada de crescimento bacteriano proveniente de uma cultura realizada nas mesmas condições descritas no item 3.1 foi misturada a 500  $\mu$ L de água MilliQ estéril, em microtubos estéreis do tipo Eppendorf®. A suspensão bacteriana resultante foi incubada a 100°C em bloco térmico por 15 minutos. Decorrido este tempo o material resultante foi centrifugado a 2800xg por cinco minutos em microcentrífuga refrigerada. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram transferidos para microtubos novos sendo estes em seguida armazenados em freezer -20°C até o momento de uso.

### 3.6 Ensaios de PCR convencional (end point PCR)

A triagem inicial dos marcadores genéticos de interesse nas cepas em estudo, ou seja, os genes *stx*, *eae*, *bfpB*, *wzx*<sub>O26</sub> e *fliC*<sub>H11</sub>, subtipagem dos genes *stx* de cepas STEC, *eae* de cepas STEC e aEPEC e pesquisa de sequências genéticas associadas aos genes *astA*, *cdtV*, *efa1*, *ehxA*, *espP*, *escN*, *etpD*, *iha*, *katP*, *nleB*, *nleE*, *pagC*, *sen*, *terE* e *toxB* foi realizada através da reação de PCR (Reação em

cadeia da polimerase) do tipo end point (convencional). As sequências de iniciadores (primers) empregados, bem como as condições de amplificação dos genes pesquisados, exceto a subtipagem do gene *eae*, encontram-se descritas nas Tabelas 2, 3 e 4. As condições de amplificação para o gene *iha* propostas por Toma *et al.*, 2004 foram modificadas. Para a subtipagem do gene *eae* foram empregados os iniciadores: EA-B1-F 5'-CGCCACTTAATGCCAGCG-3' e EAE-B 3'-CTTGATACACCTGATGACTGT-5' (Blanco *et al.*, 2004) e as seguintes condições de amplificação: 35 ciclos, com a desnaturação à 94°C por 60 segundos, anelamento à 60°C por 60 segundos e extensão à 72°C por 60 segundos. O tamanho do fragmento de DNA esperado é de 811 pb. Todos os iniciadores nos ensaios de PCR convencional foram empregados a uma concentração final de 20 µM.

Para as reações de amplificação, cujo volume final foi de 25 µL, empregou-se como template 5 µL do DNA bacteriano obtido conforme descrito no item 3.5 e o kit Hot Start Green Mix 2X (Promega®), segundo as recomendações do fabricante. Todas as reações de PCR foram previamente padronizadas quanto às condições ideais de amplificação para cada gene, tendo por base as referências citadas nas Tabelas 2, 3 e 4. Cepas de referência para cada um dos alvos pesquisados foram empregadas como controles positivos (Tabela 5). A cepa *E. coli* K12:H5 HB101 foi empregada como controle negativo em todos os ensaios. As reações de amplificação foram realizadas no sistema Veriti (Applied Biosystems®), e após o término do processo de amplificação os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose a 2%, corado em solução contendo brometo de etídio. A visualização dos géis e captação das imagens foi realizada em sistema fotodocumentador do tipo Mini Bis Pro (Uniscience).



**Tabela 2.** Primers e condições de amplificação empregadas nos ensaios de PCR convencional para caracterização dos patótipos aEPEC, STEC e do sorotipo O26:H11

Gene-alvo	Sequências iniciadoras F <sup>1</sup> /R <sup>2</sup> (5'3') <sup>3</sup>	Condições				Tamanho do fragmento (pb <sup>4</sup> )	Referências
		Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
<i>bfpB</i>	GACACCTCATTGCTGAAGTCG	30	94°C <sup>5</sup> , 30s <sup>6</sup>	63°C, 30s	72°C, 30s	910	Müller et al., 2007
	CCAGAACACCTCCGTTATGC						
<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	40	95°C, 50s	50°C, 120s	72°C, 45s	384	López- Saucedo et al., 2003
	CCACCTGCAGCAACAAGAGG						
<i>fliC<sub>H11</sub></i>	AACAACAACCTGCAGCGGATG	25	94°C, 30s	58°C, 30s	72°C, 60s	341	Banjo et al., 2018
	TCGGGCTACCACCTTCTGAT						
<i>stx1</i>	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG	40	95°C, 45s	50°C, 45s	72°C, 45s	150	López-Saucedo et al., 2003
	AGAACGCCCACTGAGATCATC						
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	40	95°C, 45s	50°C, 45s	72°C, 45s	255	López-Saucedo et al., 2003
	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG						
<i>WXZ<sub>O26</sub></i>	GGGGGTGGGTACTATATTGG	30	94°C, 30s	58°C, 30s	72°C, 60s	241	Iguchi et al., 2015
	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA						

1, F:forward; 2, R:reverse; 3, 5'3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA (reverse); 4, pb: pares de base; 5, °C: graus Celsius.; 6, s: segundos.

**Tabela 3.** Primers e condições para amplificação nos ensaios para PCR convencional da subtipagem do gene *stx*

Gene-alvo	Sequências iniciadoras F <sup>1</sup> /R <sup>2</sup> (5'3') <sup>3</sup>	Condições			Tamanho do fragmento (pb <sup>4</sup> )	Referências
		Ciclos	Desnaturação	Anelamento		
<i>stx1a</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG				478	
<i>sxt1c</i>	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA		94 °C <sup>5</sup> , 50 s <sup>6</sup>	64°C, 40 s	72°C, 60 s	252
<i>stx1d</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA				203	
<i>stx2a</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG		94 °C, 50 s	66°C, 40 s	72°C, 60 s	349
<i>stx2b</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	35	94 °C, 50 s	64°C, 40 s	72°C, 60 s	251
<i>sxt2c</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATAACAACGGGTA CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA		94 °C, 50 s	66°C, 40 s	72°C, 60 s	177
<i>stx2d</i>	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG GCCTGATGCACAGGTACTGGAC				179	
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT		94 °C, 50 s	66°C, 40 s	72°C, 60 s	411
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCCTGCTTCC TAATGGCCGCCCTGTCTCC		94 °C, 50 s	64°C, 40 s	72°C, 60 s	424
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT				573	

1, F:forward; 2, R:reverse; 3, 5'3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA (reverse); 4, pb: pares de base; 5, °C: graus Celsius.; 6, s: segundos.

**Tabela 4.** Primers e condições de amplificação empregadas nos ensaios de PCR convencional para pesquisa de marcadores de virulência diversos associados a patotipos diarréio-gênicos de *E. coli*

Gene-alvo	Sequências iniciadoras F <sup>1</sup> /R <sup>2</sup> (5' 3') <sup>3</sup>	Condições				Tamanho do fragmento (pb <sup>4</sup> )	Referências
		Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GCGAGTGACGGCTTTGT	30	95°C <sup>5</sup> , 30s <sup>6</sup>	55°C, 120s	72°C, 120s	111	Yamamoto & Echeverria, 1996
<i>cdtV</i>	TTCATTGTTGCGCTCCTG TTTATAAGCTGGTATCCTG	30	94°C, 60s	50°C, 60s	72°C, 60s	755	Cergole-Novella et al., 2007
<i>efa1</i>	AAGGTGTTACAGAGATTA TGAGGCGGCAGGATAGTT	35	94°C, 60s	51°C, 60s	72°C, 60s	480	Nicholls et al., 2000
<i>ehxA</i>	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	30	94°C, 30s	57°C, 90s	72°C, 120s	1551	Schmidt et al., 1995
<i>espP</i>	AAACAGCAGGCACTTGAACG GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT	30	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 150s	1830	Beutin et al., 2005
<i>escN</i>	CGACGACTATTGCAGAGT GCCTTATCTGCTTCAGGA	30	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 150s	499	Vieira et al., 2016
<i>etpD</i>	CGTCAGGAGGATGTTTCAG CGACTGCACCTGTTCTGATTA	30	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 70 s	1062	Beutin et al., 2005

**Tabela 4** (Continuação)

<i>iha</i>	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	30	94°C, 60s	52°C, 60s	72°C, 150s	1305	Toma et al., 2004
<i>katP</i>	CTTCCTGTTCTGCTGATTCTTCTGG AACTTATTTCTCGCATCATCC	30	94°C, 30s	58°C, 150s	72°C, 60s	2125	Beutin et al., 2005
<i>nleB</i>	GGTGTGCTGGTAGATGGA CAGGGTATGATTCTTGTTTATG	35	95°C, 60s	53°C, 60s	72°C, 60s	175	Afset et al.,2006
<i>nleE</i>	CTAATACTCAGGGCGTGTC ACCGTCTGGCTTTCTCGTTA	35	95°C, 60s	53°C, 60s	72°C, 60s	192	Afset et al.,2006
<i>pagC</i>	ATGAGTGGTTCAAGACTGG CCAACCTCCAACAGTAAATCC	30	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 150s	521	Karmali et al., 2003
<i>sen</i>	GGATGGAACCATACCTGG CGCAATCAATTGCTAATGC	30	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 150s	551	Karmali et al., 2003
<i>terE</i>	TAAAAGGCGGCAACGTATCTCTGA CCGTCCC GTTGTCGTTGTTGTAA	30	95°C, 30s	55°C, 60s	72°C, 60s	399	Vieira et al., 2016
<i>toxB</i>	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	30	94°C,30s	60°C, 60s	72°C, 60s	602	Tatsuno et al., 2001

1, F:foward; 2, R:reverse; 3, 5' 3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA (reverse); 4, pb: pares de base; 5, °C: Graus Celsius.; 6, s: segundos.

**Tabela 5.** Cepas de referência empregadas como controles positivos nos diversos ensaios de PCR convencional e PCR em tempo real para pesquisa de marcadores de virulência diversos associados a patótipos diarréio-gênicos de *E. coli*

<b>Cepa</b>	<b>Gene(s) – alvo(s)</b>
EAEC 17-2	<i>astA</i>
<i>E. coli</i> Su4321-41 (O13:K11:H11)	<i>fliC<sub>H11</sub></i>
<i>E. coli</i> H311b (O26:K60:H <sup>-</sup> )	<i>wzxO26</i>
<i>E. coli</i> 2348/69	<i>bfpB</i>
STEC EDL933 (O157:H7)	<i>eae, efa-1, ehxA, escN, espK, espM1, espN, espP, etpD, iha, katP, toxB, nleB, nleE, sen, pagC, stx1a, stx2a, terE, ureD, z2098, z2099, z2121</i>
STEC 493/89 (O157:H <sup>-</sup> )	<i>cdt-V</i>
STEC 99/3294 (O26:H11)	<i>espV</i>
STEC DG 131/3 (174:H8)	<i>stx1c, stx2b</i>
STEC VTB60 (O165:H25; O136:H <sup>-</sup> )	<i>stx2c</i>
STEC MHI813 (O8:K85:HR; ONT:H19)	<i>stx1d</i>
STEC CI-3 (O113:H21)	<i>stx2d</i>
STEC E-D42 (O101:H <sup>-</sup> )	<i>stx2e</i>
STEC T4 / 97 (O128:H2)	<i>stx2f</i>
STEC S86 (O2:H25)	<i>stx2g</i>

### **3.7 Ensaios de PCR em tempo real (qRT-PCR) para pesquisa dos genes Z2098, Z2099, Z2121, espK, espN, espM1, espV e ureD**

Ensaios de PCR em tempo real foram empregados para pesquisa dos genes Z2098, Z2099, Z2121, espK, espM1, espN, espV e ureD, e constaram de três etapas distintas:

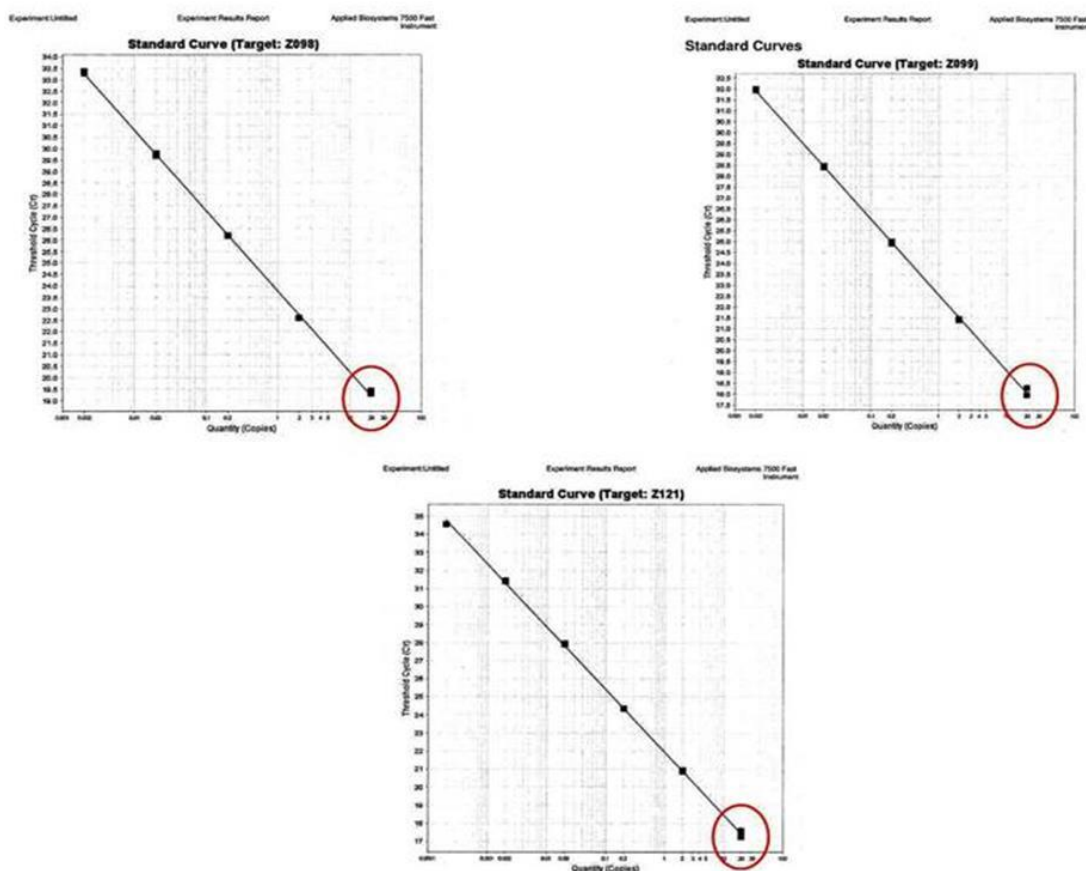
#### **3.7.1 Estabelecimento dos controles positivo e negativo**

Para o estabelecimento dos controles utilizados nos ensaios de PCR em tempo real, uma análise de dados do genoma das cepas EDL933, Sakai, *E.coli* K12:H5, obtidos em *databases* de domínio público, e de um conjunto de 112 cepas de aEPEC pertencentes a coleção do Instituto Adolfo Lutz, que vêm sendo caracterizadas por sequenciamento de genoma total, foi realizada empregando o método de *Large Scale BLAST Ratio Analysis* (LS-BSR). Para inferir a presença dos alvos de interesse foram considerados apenas scores BSR superiores a 0.8. Após as devidas análises a cepa EDL933 foi definida como controle positivo para os genes Z2098, Z2099, Z2121, espK, espM1, espN e ureD, e a cepa Ec 403/03 foi estabelecida como controle positivo para o gene espV. Ambas apresentaram score 1.0 (máximo) para os genes pesquisados. A cepa K12:H5 foi estabelecida como controle negativo (score < 0.1) para todos os genes de interesse.

#### **3.7.2 Determinação do limite mínimo de detecção dos genes alvo nas cepas estabelecidas como controle positivo**

O limite mínimo de detecção (LMD) de cada um dos genes pesquisados por PCR em tempo real, definido como sendo a menor quantidade de DNA na qual é possível a detecção específica do alvo desejado, foi determinado pelo método da curva-padrão (Figura 4).

Para tanto, o DNA das cepas EDL 933 e Ec 403/03 foi extraído empregando o kit de extração *High Pure PCR template Preparation Kit* (Roche®), de acordo com as recomendações do fabricante. Após o procedimento de extração, o material eluído teve a sua concentração determinada em equipamento do tipo nanodrop. Uma alíquota do DNA dosado foi diluída em água MilliQ estéril para uma concentração de 10 ng/μL. A partir desta diluição o DNA foi novamente diluído em série, empregando o fator 10. Foram efetuadas no total, a partir da primeira diluição, sete diluições seriadas que corresponderam à concentração inicial de 20 ng/μL, incluindo a primeira diluição, até 0,2 ng/μL, na diluição 10<sup>-8</sup>. Em cada reação de PCR foram empregados como template 2 μL do material diluído. As reações de amplificação ocorreram conforme descrito será descrito no item a seguir. Os LMD, bem como os intervalos de *cycle of threshold* (CT) determinados para cada gene estão descritos na Tabela 7.



**Figura 4.** Curva padrão dos genes Z2098, Z2099 e Z121, demonstrando linearidade após sucessivas diluições de DNA da cepa EDL 933. Os círculos em vermelho indicam o limite de detecção de sinal específico para cada alvo e respectivo valor de CT onde este limite foi alcançado.

### 3.7.3 Pesquisa dos genes-alvo nas cepas em estudo

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados empregando o kit *Sso Advanced Universal Probes Supermix* (Bio-Rad), contendo o fluoróforo ROX como referência passiva, de acordo com as recomendações do fabricante. Primers e sondas empregadas nestes ensaios estão descritos na Tabela 6. A determinação da concentração ideal dos primers e das sondas para as reações foi realizada empiricamente testando-se, para cada gene, três concentrações finais para os primers, que foram: 300, 600 e 900 nM, e três concentrações finais para as sondas, que foram 100, 200 e 300 nM. Ao final dos testes optou-se por pela concentração de 300 nM para os primers, e de 100 nM para as sondas.



Foi possível empregar as mesmas concentrações de primers e sondas para os distintos genes pesquisados, bem como as mesmas condições de amplificação que foram: 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos para anelamento e extensão. O DNA template foi o mesmo obtido conforme descrito no item 3.5.

Para interpretação dos resultados os intervalos de CT máximos considerados estão descritos na Tabela 7. No caso de cepas que apresentaram valor mínimo de CT abaixo de 14, estas, após a análise de compatibilidade do multicomponente da reação (fluoróforo repórter/referência passiva) e da curva exponencial de amplificação, foram consideradas inconclusivas, e um novo ensaio com uma diluição de uma alíquota do DNA template foi realizado. Se o mesmo padrão de resultado persistiu, a cepa foi então considerada negativa. As reações de PCR em tempo real ocorreram na plataforma *7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, empregando microplacas com capacidade de 100 µL, próprias para uso neste equipamento. A análise dos dados gerados foi feita pelo software da própria plataforma, segundo instruções do fabricante.

**Tabela 6.** Primers e sondas empregadas nos ensaios de PCR em tempo real para amplificação dos genes *Z2098*, *Z2099*, *Z2121*, *espK*, *espM1*, *espN*, *espV* e *ureD*

Gene alvo	Primer F <sup>1</sup> /R <sup>2</sup> /sonda (5'3') <sup>3</sup>	Referência
<i>Z2098</i>	CTGAAAAGAGCCAGAACGTGC	
	TGCCTAAGATCATTACCCGGAC	
<i>Z2099</i>	<b>[FAM]<sup>4</sup>TA</b> ACTGCTATACCTCCGCGCCG <b>[BHQ1]<sup>5</sup></b>	Delannoy et al., 2013b
	TAGCGGGACAATTGTCACGG	
<i>Z2121</i>	GTCTTTCGGAGAAACATTCTGCC	
	<b>[FAM]</b> ATATTGATGACAGCGTATGGGCCG <b>[BHQ]</b>	
<i>espK</i>	GATGGCAGATAATAACGAAGCAAC	Delannoy et al., 2016
	CAGCCGTTGAAGCATCAGCG	
<i>espM1</i>	<b>[FAM]</b> AGCAGCATTCTTGCAGACCCTTACGG <b>[BHQ]</b>	Delannoy et al., 2013a
	GCAGRCATCAAAGCGAAATCACACC	
<i>espN</i>	TCGTTTGGTAACTGTGGCAGATACTC	Delannoy et al., 2013a
	<b>[FAM]</b> ATTCAGATAGAAGAAGCGCGGGCCAG <b>[BHQ]</b>	
<i>espV</i>	GCGCTCTATCCGCTTTAATGTTAAC	Delannoy et al., 2016
	CCATCCATGAATATCTTTAGTACTCTGC	
<i>ureD</i>	<b>[FAM]</b> TGCTTACCGTCTCCAGTATACAGCCGCT <b>[BHQ]</b>	Delannoy et al., 2016
	GACATATTTGTTTATGTCATCAGGAGCGG	
<i>ureD</i>	CCTCAGGATATGGATGGCCTACTGGC	Delannoy et al., 2016
	<b>[FAM]</b> AATGCTCTCGGCAATCGAATCCTTGACTC <b>[BHQ]</b>	
<i>ureD</i>	TCAGGTTCCCTCGTCTGATGCCGC	Delannoy et al., 2016
	CTGGTTCAGGCCTGGAGCAGTCC	
<i>ureD</i>	<b>[FAM]</b> CTTGCAACACGTTACGCTGCCGAGTATT <b>[BHQ]</b>	Delannoy et al., 2016
	GCAATAATTGACTCTGATTGCC	
<i>ureD</i>	GCTGCTGCGGTAAAATTTACT	Delannoy et al., 2016
	<b>[FAM]</b> TACGCTGATCACCATGCCTGGTG <b>[BHQ]</b>	

1, F: forward; 2, R: reverse; 3, 5' 3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA (reverse); 4, FAM: 6-carboxyfluoresceína; 5, BHQ: Black Hole Quencher 1.

**Tabela 7.** Limite mínimo de detecção (LMD) e intervalos de CT estabelecidos para interpretação dos ensaios de PCR em tempo real para pesquisa dos genes *espK*, *espN*, *espM1*, *espV*, *ureD*, *z2098*, *z2099* e *z2121*

Gene- alvo	LMD <sup>1</sup> (pg <sup>2</sup> )	Intervalo de CT <sup>3</sup>
<i>espK</i>	20	18-29
<i>espN</i>	2	19-28
<i>espM1</i>	20	18-29
<i>espV</i>	2	20-28
<i>ureD</i>	20	18-29
<i>z2098</i>	20	19-30
<i>z2099</i>	20	18-28
<i>z2121</i>	20	17-28

1, LMD: Limite de detecção; 2, pg: picogramas; 3, CT: cycle of of threshold.

### 3.8 Pesquisa das Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)

A pesquisa das sequências CRISPR foi realizada por PCR em tempo real conforme descrito no item 3.7 empregando primers, sondas e as condições de amplificação descritas na Tabela 8. Para as reações de PCR em tempo real foi empregando o kit *Sso Advanced Universal Probes Supermix* (Bio-Rad), contendo o fluoróforo ROX como referência passiva, de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado 2µL do DNA template como descrito no item 3.5 e a concentração de 300 nM de cada um dos primers e das sondas. As condições da amplificação foram 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e 40°C por 30 segundos.

**Tabela 8.** Primers e sondas utilizadas na PCR em tempo real para pesquisa das sequências CRISPR C, D e E

Gene alvo	Primer F <sup>1</sup> /R <sup>2</sup> /sonda (5'3') <sup>3</sup>	Referência
CRISPR SP_026_C	ACAATCGTGTGTAATTCGCGG GATAAACCGTGGTACGGAACA [FAM] <sup>4</sup> TGCTGTCTATATTTTCGACCAGTGTTC [BHQ] <sup>5</sup>	Delannoy et al., 2012
CRISPR SP_026_D	TGAAACCACTCGCGGCAGAT ATAAACCGATCTCCTCATCCTC [FAM]CCAGCTACCGACAGTAGTGTGTTCC[BHQ]	
CRISPR SP_026_E	TGAAACCACTCGCGGCAGAT ATCAACATGCAGCGCGAACG [FAM]CCAGCTACCGACAGTAGTGTGTTCC[BHQ]	Delannoy et al., 2015

1, F: forward; 2, R: reverse; 3, 5'3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA; 4, FAM: 6-carboxyfluoresceína; 5, BHQ1: Black Hole Quencher 1.

### 3.9 Tipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para a rede Pulsenet, para tipagem de STEC não-O157 (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>).

A realização desta metodologia consistiu das seguintes etapas: extração do DNA genômico, digestão enzimática do DNA extraído, corrida eletroforética e análise dos padrões de macrorrestrrição.

#### 3.9.1 Extração do DNA genômico

Nesta etapa, uma colônia isolada de cada uma das cepas bacterianas a serem analisadas foi semeada em ágar TSA e incubada por cerca de 20 horas a 35°C para obtenção de crescimento confluyente. A partir desta cultura foram preparadas suspensões bacterianas dissolvendo-se uma alíquota do crescimento obtido em cerca de 3 mL de solução de suspensão celular (SSC) (Anexo II), até que as suspensões atingissem uma densidade óptica de 0.8 a 1.0 lida a 610 nanômetros em espectrofotômetro. Em seguida,

uma alíquota de 300 µL das suspensões bacterianas preparadas foi transferida para tubos estéreis do tipo *Eppendorf*, onde previamente 15 µL de proteinase K a uma concentração final de 0,5 mg/mL havia sido adicionado; a mistura foi reservada. Seguiu-se o preparo de uma solução de agarose específica para PFGE (Seaken Gold) em tampão TE (Tris 10mM:EDTA 1mM, pH 8,0), a uma concentração de 1%. Após, 300 µL da agarose fundida foi adicionada aos tubos do tipo *Eppendorf* contendo a suspensão bacteriana tratada com proteinase K; imediatamente essa mistura foi dispensada em moldes específicos para o preparo de plugs de PFGE. O material foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos em temperatura ambiente para que a agarose misturada à suspensão bacteriana pudesse solidificar. Foram preparados três plugs para cada cepa em estudo. Após a solidificação dos plugs a etapa seguinte consistiu na lise das células bacterianas contidas nos plugs (lise *in situ*). Para tanto, os plugs em estado sólido foram transferidos para tubos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL, contendo 5 mL de solução de lise celular (SLC) previamente preparada (Anexo II). Este material foi incubado a 54°C sob agitação (150 rpm) vigorosa e constante, por um período de duas horas (esse tempo pode ser estendido para três a 16 horas). Na etapa seguinte, decorrido o período de incubação, foram realizadas lavagens dos plugs com tampão TE (Anexo II) pré-aquecido à 50-55°C na qual os tubos contendo os plugs foram retirados do agitador e a solução de lise foi descartada, foi adicionada 10-15 mL de tampão TE e novamente os tubos contendo os plugs foram incubados sob agitação (150 rpm) por 10-15 minutos, esta etapa foi repetida por quatro a seis vezes. Na última lavagem dos plugs o tampão TE foi removido e acrescentou-se 10 mL de tampão TE, estes plugs foram mantidos em geladeira até o momento de uso, sendo a sua durabilidade de seis meses.

### 3.9.2 Digestão enzimática

Nesta etapa ocorreu a digestão do DNA genômico contido nos plugs. Um pedaço de aproximadamente 2 mm de espessura do plug referente às cepas em estudo foi cortado e transferido para microtubos do tipo eppendorf. Em seguida foi digerido em 200 µL de solução contendo 30 U da enzima de restrição *Xba*I acrescida do tampão de enzima apropriado e 0.4 µL de BSA (*bovine serum albumina*). A digestão foi realizada a 37°C por cerca de 18 horas. Decorrido o período de digestão, a cada tubo eppendorf adicionou-se 200 µL de tampão TBE 0.5x previamente preparado a partir da diluição de uma solução 10x concentrada do tampão TEB (Anexo II). Os tubos permaneceram por 10 minutos em contato com o tampão TBE 0.5x, e decorrido este o tampão foi removido.

### 3.9.3 Corrida eletroforética

Após a digestão os plugs contendo fragmentos de DNA digeridos foram submetidos à corrida em eletroforese de campo pulsado no sistema CHEF-DRII (Bio Rad) seguindo as condições de corrida propostas pelo protocolo do CDC para tipagem de STEC não-O157. Foi realizada a montagem do gel de corrida utilizando-se agarose específica para PFGE, agarose Seaken Gold®, que foi utilizada na concentração de 1%. Em seguida os plugs contendo os fragmentos de DNA digeridos foram colocados sob a superfície do pente do aparato de corrida próprio para o sistema CHEF-DRII (Bio Rad), e a agarose foi dispensada neste aparato de corrida. Após a completa solidificação do gel de agarose que ocorreu após 30 minutos o pente foi retirado e iniciou-se a eletroforese. Utilizou-se pulso inicial de 6.7 segundos, pulso final de 35.3 segundos, voltagem de 6V, ângulo de 120°C e tempo de corrida de 18 horas. Seguiu-se então à montagem do gel de corrida. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 30 minutos e lavado por três vezes sob suave agitação em água destilada estéril. Após a última lavagem o gel foi visualizado e uma imagem digital em formato TIFF foi captada em sistema fotodocumentador próprio para análise de DNA.

### 3.9.4 Análise dos padrões de macrorestrição

A análise dos perfis de macrorestrição gerados pela digestão do DNA genômico das cepas em estudo foi realizada no programa Bionumerics versão 7.6 (*Applied Maths*). Índices de similaridade genética foram determinados através do coeficiente de similaridade de Dice com otimização e tolerância de 1,5 %.

### 3.10 Tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos (MLST)

As cepas em estudo foram tipadas por MLST de acordo com o esquema europeu no qual segmentos internos dos genes constitutivos *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* foram sequenciados (ambas as fitas de DNA) para identificação dos respectivos alelos. Para as reações de amplificação, cujo volume final foi de 25 µL, empregou-se como template 3 µL do DNA bacteriano obtido conforme descrito no item 3.5, e foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 5 u/µL da enzima *Taq* polimerase G2 Hot Start (Promega®), 25 µM cloreto de magnésio (Mg CL<sub>2</sub>) (Promega®), 10mM DNTP (Promega®), 0,671 µM de cada primer, e o tampão enzimático específico (5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer). As amplificações foram realizadas no sistema Veriti (Applied Biosystems) e as sequências de primers e condições de amplificação estão descritos na Tabela 10.

Após etapa de amplificação foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com a finalidade de observar se o gene-alvo havia sido amplificado e a ausência de bandas inespecíficas, e/ou dímeros de primers que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Tendo sido constatada a presença de apenas uma banda de forte intensidade, e com tamanho compatível com o gene pesquisado foi realizada a etapa de purificação do produto de PCR.

### **3.10.1 Purificação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG) a 20% em solução de Cloreto de sódio (NaCl) 2,5M**

Nesta etapa 20  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR são transferidos dos tubos de 0,2  $\mu\text{L}$  para a placa de PCR de 96 poços com capacidade de 100  $\mu\text{L}$  (Neptune®). Adicionou-se 24 $\mu\text{L}$  de solução PEG 20% (Anexo II) por poço ou reação, selou-se a placa, centrifugando-a a 28 xg por um minuto e a placa foi deixada por uma hora em temperatura ambiente. Após este período foi realizada uma nova centrifugação a 1792 xg por uma hora, e a placa foi invertida a fim de remover todo o sobrenadante, esta placa foi novamente centrifugada, mas agora de maneira invertida e sobre papel absorvente a fim de remover toda a solução a 28xg por um minuto. Adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de ETOH 70% gelado (4°C) por cada poço utilizado. Esta placa foi centrifugada a 1792xg por 10 min à 4°C, e o sobrenadante foi desprezado, sendo esta etapa repetida mais uma vez. Em seguida a placa foi invertida, centrifugada nesta posição a fim de sair todo o excesso de ETOH, e deixada em repouso por 15 minutos para que ocorresse a completa evaporação do ETOH. Ao final foi adicionado a cada poço da placa 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, e a mesma foi centrifugada, selada e armazenada a -20°C.

### **3.10.2 Protocolo Big Dye®**

Para as reações de sequenciamento empregou-se o kit Big Dye® Terminator V 3.1 (Applied Biosystems). O DNA a ser sequenciado teve sua concentração ajustada para 10 ng/ $\mu\text{L}$  e os primers F e R (fitas senso e anti-senso amplificadas separadamente), específicos para cada um dos genes-alvo foram utilizados a uma concentração final de 0,671  $\mu\text{M}$ . A leitura das reações foi feita por eletroforese capilar em sequenciador do tipo 3500 *Series Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific). No protocolo do Big Dye foi utilizado um volume total de 5  $\mu\text{L}$  da reação por cepa sendo: 1  $\mu\text{L}$  da amostra purificada, 2  $\mu\text{L}$  de cada primer na concentração citada, 0,25  $\mu\text{L}$  do Big Dye, 0,875  $\mu\text{L}$  do tampão específico e da água ultrapura. Em cada placa além das amostras de DNA foi adicionado um controle para inferir a qualidade da reação de sequenciamento denominado pGEM 3Zf (+) na concentração de 200ng/  $\mu\text{L}$ , que foi realizado nas mesmas quantidades das cepas



do BigDye descritas acima, utilizando o primer M13(-21) 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3' na concentração 0.8 pmol/ $\mu$ L.

### **3.10.3 Purificação dos produtos de sequenciamento com Etanol Acetato de Sódio (NaOAc/ETOH)**

Nesta etapa da purificação dos produtos de sequenciamento adicionou-se 67  $\mu$ L de solução de NaOAc/ETOH (Anexo II) por reação, a solução foi preparada no momento do uso. A placa foi selada e centrifugada a 28xg por um minuto a 4°C, e logo após foi deixada em local escuro por 45 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo a placa foi novamente centrifugada a 1792xg por uma hora a 4°C, a placa foi invertida e centrifugada nesta posição a fim de haver a total remoção da solução de NaOAc/ETOH a 28xg por um minuto a 4°C. Adicionou-se 150  $\mu$ L de ETOH 70% por poço da placa e centrifugou-se a 1792xg por 10 minutos a 4°C. Retirou-se o excesso do ETOH 70% invertendo-se a placa e centrifugando-a 1792xg por dez minutos a 4°C. A placa foi deixada em local escuro por 15 minutos para secar, posteriormente foi selada, e armazenada a -20°C até ser levada para o sequenciador.

Após a etapa de purificação com NaOAc/ETOH foi adicionado 10  $\mu$ L de formamida Hi-Di, que é utilizada para ressuspender as amostras de DNA antes da injeção eletrocinética em sistemas de eletroforese capilar, a placa foi centrifugada a 28xg por um minuto. Posteriormente ela foi colocada no termociclador, no sistema Veriti (Applied Biosystems®) para a desnaturação do DNA a 95°C por cinco minutos, e ao término esta placa foi posta no gelo por aproximadamente cinco minutos, para posterior análise por eletroforese capilar em sequenciador do tipo 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

#### **3.10.4 Análise dos produtos gerados no sequenciamento**

Após o sequenciamento, as regiões das fitas senso e anti-senso do DNA foram analisadas pelo programa *PHPH-Electropherogram quality analysis* (EMBRAPA), para avaliação da qualidade dos eletroferogramas e construção dos contigs. Em seguida, os contigs obtidos foram alinhados e editados junto às sequências de referência para cada gene, obtidas no banco de dados Enterobase, através do software *Bioedit*. Posteriormente, estas mesmas sequências foram introduzidas no banco de dados para obtenção dos *Sequence Types* (ST) e Complexos Clonais (CC), a partir dos alelos identificados para cada gene.

**Tabela 9.** Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificação de regiões internas dos genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*

Gene-alvo	Sequências iniciadoras F/R <sup>1</sup> (5'3') <sup>2</sup>	Condições				Tamanho do fragmento (pb <sup>3</sup> )	Referências
		Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT			54°C		583	
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC			54°C		806	
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC			60°C		911	
<i>icd</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	35	95°C <sup>4</sup> 60s <sup>5</sup>	54°C	72°C 60s	878	Wirth et al., 2006
<i>mdh</i>	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT CGCGCTGATGAAAGAGATGA			60°C		932	
<i>purA</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA CGCATTGCTTTACCCTGACC			54°C		816	
<i>recA</i>	TCGTCAAATCTACGGACCGGA			58°C		780	

1, F:foward, R:reverse; 2, 5'3': extremidade 5' do DNA (forward) e extremidade 3' do DNA (reverse); 3, pb: pares de base; 4, °C: Graus Celsius.; 5, s: segundos.

## 4. Resultados

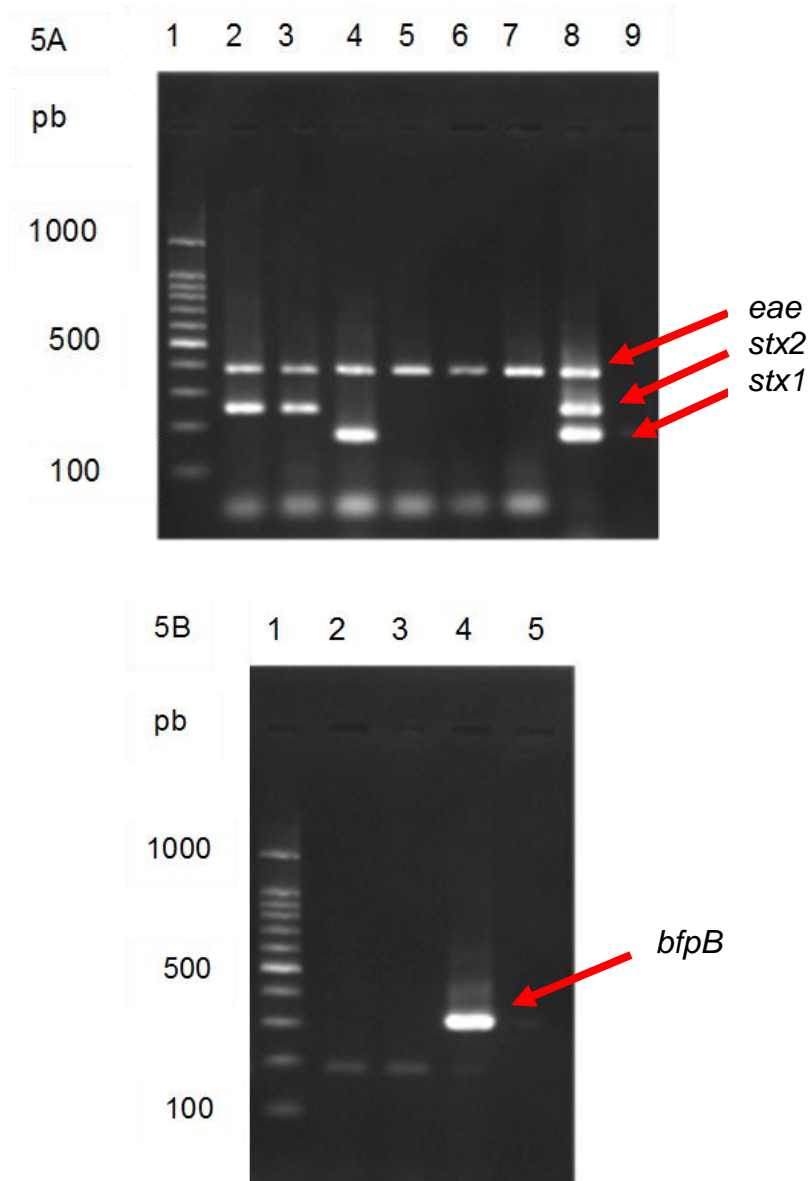
### 4.1 Patotipos diarréiogênicos identificados nas cepas *E. coli* O26:H11

Após serem confirmadas por testes bioquímicos e moleculares como *E. coli* O26:H11, as 48 cepas em estudo foram submetidas a ensaios de PCR para pesquisa dos genes *stx*, *eae* e *bfp*, com o intuito de identificar os patotipos diarréiogênicos STEC e EPEC. Dez (21%) destas 48 cepas de *E. coli* O26:H11 foram classificadas como STEC por apresentarem a amplificação dos genes *stx*. Todas elas foram também positivas para o gene *eae* e não apresentaram a amplificação do gene *bfp*. Além disso, oito (80%) destas cepas STEC foram positivas para *stx1* e duas (20%) apresentaram *stx2*. Nenhuma das cepas STEC O26:H11 apresentou os genes *stx1* e *stx2* concomitantemente. Todas as 10 cepas classificadas como STEC apresentaram a capacidade de secretar a forma biologicamente ativa da Toxina Shiga, conforme evidenciado em ensaios de citotoxicidade empregando células Vero cultivadas *in vitro*.

Trinta e oito (79%) das cepas *E. coli* O26:H11 foram portadoras do gene *eae* e negativas para a presença dos genes *stx* e *bfp* sendo, portanto, classificadas como aEPEC.

**Tabela 10.** Frequência dos patotipos aEPEC e STEC do sorotipo O26:H11

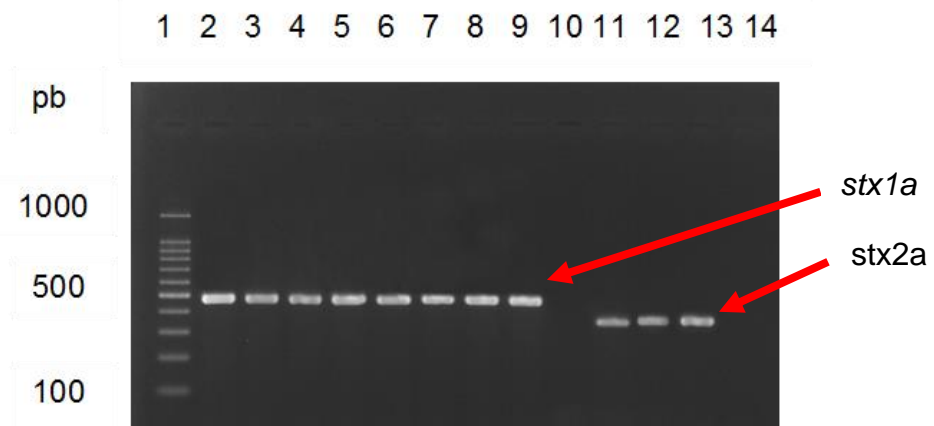
Número de cepas	Patotipo	Genes
38 (20%)	aEPEC	<i>eae</i>
8 (80%)	STEC	<i>eae, stx1</i>
2 (20%)	STEC	<i>eae, stx2</i>



**Figura 5.** Gel de agarose representativo de um ensaio de PCR para pesquisa dos genes *stx* e *eae* (5A) e *bfpB* (5B) em cepas de *E. coli* O26:H11. Na figura 5A as canaletas dois e três apresentam STEC *stx2*+, enquanto que a STEC *stx1* encontra-se no poço quatro. As EPEC (gene *eae*) encontram-se nas canaletas cinco, seis e sete, o controle positivo (EDL 933) e o negativo (K12:H5) estão nos poços oito e nove respectivamente. Na figura 5B os poços dois e três encontram-se as aEPEC sem o gene *bfpB*, já nos poços quatro e cinco estão os controles positivo (*E. coli* 2348/69) e negativo (K12:H5).

## 4.2 Subtipagem dos genes *stx* presentes nas cepas STEC O26:H11

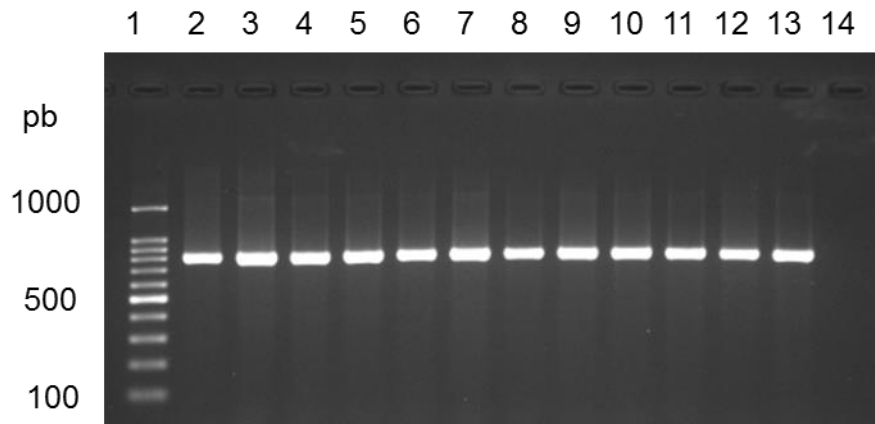
A subtipagem dos genes *stx* nas cepas STEC O26:H11 revelou a presença do subtipo 1a em todas as oito cepas portadoras de *stx1* e do subtipo 2a nas duas cepas portadoras de *stx2* (Figura 6). Nenhuma das cepas STEC analisadas apresentou os demais subtipos de *stx1* e *stx2* além destes mencionados.



**Figura 6.** Gel de agarose representativo de um ensaio de PCR para a subtipagem dos genes *stx* nas cepas STEC O26:H11. Nas canaletas dois ao nove observam-se as cepas de STEC *stx1a* com 478 pb, enquanto que os poços 11 e 12 representam as cepas de STEC *stx2a* com 349pb. Na canaleta 1 observa-se o marcador de massa de DNA de 100 pb (Sinapse®), os controles positivos para *stx1a* e *stx2a* encontram-se nos poços nove e 13 respectivamente, e os controles negativos (K12:H5) nas canaletas dez e 14.

### 4.3 Subtipagem do gene *eae* nas cepas STEC e aEPEC O26:H11

Com relação ao gene *eae* um único alelo, corresponde ao subtipo  $\beta$ 1 (Figura 7) foi identificado em todas as cepas O26:H11 estudadas, independente de serem STEC ou aEPEC.



**Figura 7.** Gel de agarose ilustrando a amplificação de um fragmento de 811 pb correspondente ao alelo  $\beta$ 1 do gene *eae* nas cepas STEC e aEPEC O26:H11. As canaletas de 2 a 12 representam cepas STEC e aEPEC O26:H11. As canaletas 13 e 14 contém os controles positivo e negativo, respectivamente, para o gene *eae*  $\beta$ 1. Na canaleta 1 encontra-se o marcador de massa de DNA de 100 pb (Sinapse®).

### 4.4 Pesquisa de sequências genéticas associadas a mecanismos de virulência diversos

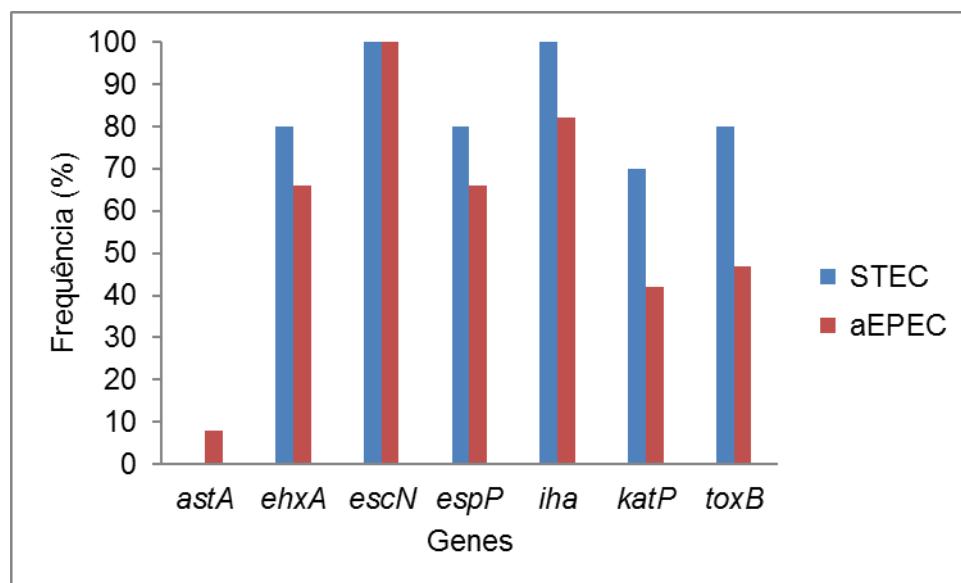
#### 4.4.1 Ocorrência de sequências genéticas associadas aos genes *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, *etpD*, *iha*, *cdt-V* e *astA* presentes em elementos genéticos diversos

A Figura 8 ilustra a ocorrência dos genes *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, *iha*, *astA* nas cepas STEC e aEPEC O26:H11. Conforme é possível observar dentre as cepas STEC foram encontradas as seguintes frequências para os genes *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, e *iha*, respectivamente: 100% (10/10), 80% (8/10), 80% (8/10), 70% (7/10), 80% (8/10), 100% (10/10).

Quanto às aEPEC as frequências observadas para *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, *iha*, *astA* foram, respectivamente: 100% (38/38), 66% (25/38), 66% (25/38), 42% (16/38), 47% (18/38), 82% (31/38) e 8% (3/38).

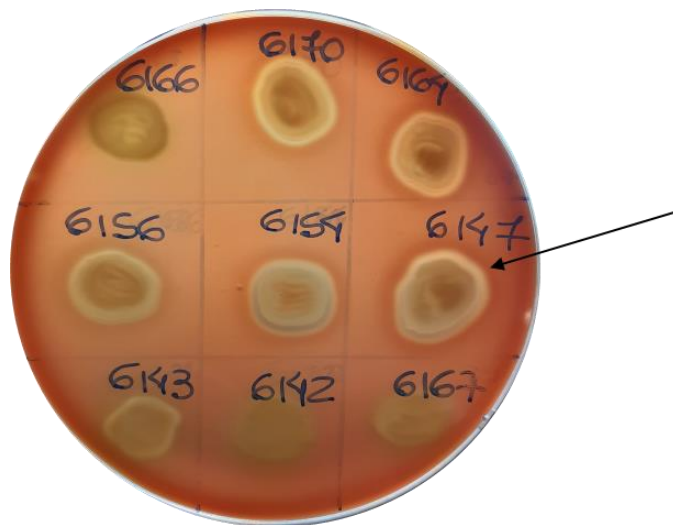
Nenhuma das cepas STEC apresentou os genes *etpD* e *cdt-V* e *astA*, assim como dentre as aEPEC todas foram negativas para *etpD* e *cdt-V*.

As cepas positivas para o gene *ehx*, foram submetidas a ensaios fenotípicos para verificar a capacidade de secreção da enterohemolisina de EHEC. Foi possível observar que dentre as oito cepas STEC que apresentaram a sequência *ehx*, duas (25%) demonstraram a capacidade de expressá-lo. Com relação às aEPEC, das 25 cepas portadoras de *ehx*, em 14 (56%) foi evidenciada a formação de halos de beta hemólise confirmando a expressão do gene. A Figura 9 ilustra a expressão do fenótipo enterohemolítico nas STEC e aEPEC O26:H11 cepas estudadas.



**Figura 8.** Ocorrência de sequências genéticas associadas aos genes *escN*, *ehx*, *espP*, *katP*, *toxB*, *iha*, *astA* em cepas de STEC e aEPEC O26:H11.





**Figura 9.** Ensaio para pesquisa da expressão de beta hemolisina (enterohemolisina de EHEC) em cepas STEC e aEPEC O26:H11 previamente investigadas e positivas para a presença do gene *ehx*. A seta preta indica a zona de beta hemólise provocada pela destruição total das hemácias de carneiro através da atuação da *Ehx*.

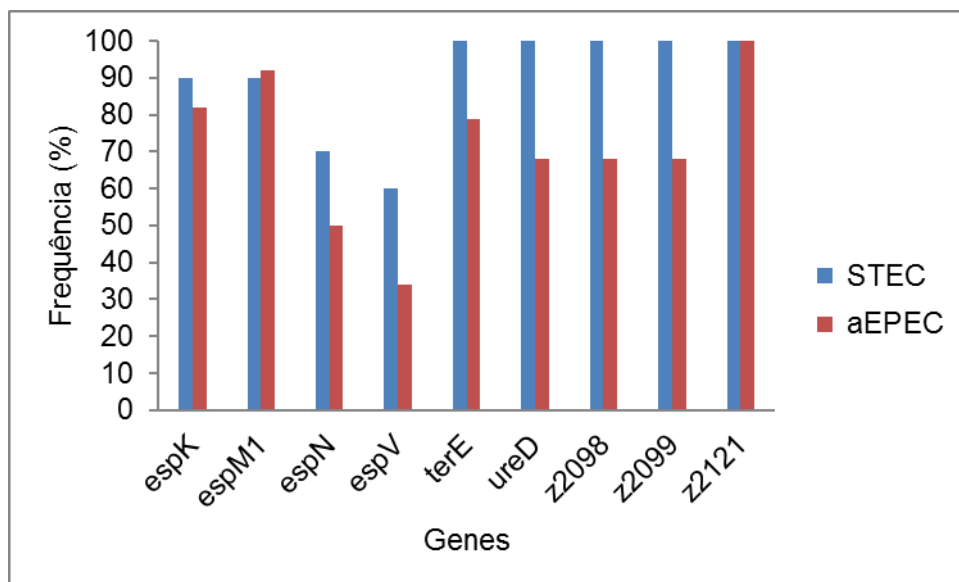
#### 4.4.2 Ocorrência dos genes *efa-1*, *nleB*, *nleE*, *sen* e *pagC* associados à ilha genômica OI-122

Com relação aos genes *efa-1*, *nleB*, *nleE*, *sen* e *pagC*, marcadores específicos da OI-122, observou-se o mesmo padrão em sua distribuição tanto para as STEC como para as aEPEC O26:H11, ou seja, todas as cepas foram positivas para *efa-1*, *nleB*, *nleE*, *sen* e nenhuma delas apresentou *pagC*.

#### 4.4.3 Ocorrência de genes associados às ilhas genômicas OI-57 (*Z2098*, *Z2099*, *Z2121*), OI-43/OI-48 (*ureD*, *terE*), OI-44 (*espV*), OI-50 (*espK*, *espN*) e OI-71 (*espM1*)

Conforme demonstra a Figura 10, diferentes frequências foram observadas dentre as STEC e aEPEC O26:H11 em relação a ocorrência de genes marcadores específicos das ilhas genômicas 57, 48, 44, 50 e 71, exceto para o gene *Z2121*, cuja frequência foi idêntica em ambos os grupos. Os genes *Z2098* e *Z2099* foram encontrados em 100%

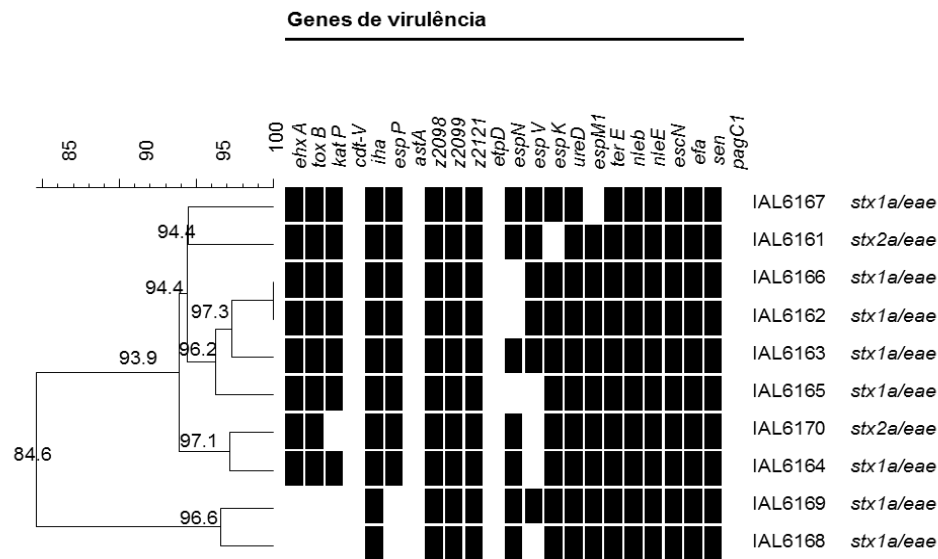
(10/10) das STEC, ao passo que dentre as aEPEC a frequência destes genes foi de 68% (26/38). Para o gene *ureD* observou-se uma frequência de 100% nas cepas STEC (10/10) e 68% (26/38) nas cepas aEPEC. O gene *terE* foi encontrado em 100% (10/10) das STEC, e nas aEPEC a sua frequência foi de 79% (30/38). Quanto ao gene *espV* este marcador esteve presente em 60% (6/10) das STEC e em 34% (13/38) das aEPEC. Os genes *espK* e *espN* foram encontrados em 90% (9/10) e 70% (7/10) das STEC, respectivamente, e em 82% (31/38) e 50% (19/38) das aEPEC, respectivamente. Por último, o gene *espM1* ocorreu em 90% (9/10) das cepas STEC e em 92% (35/38) das aEPEC.



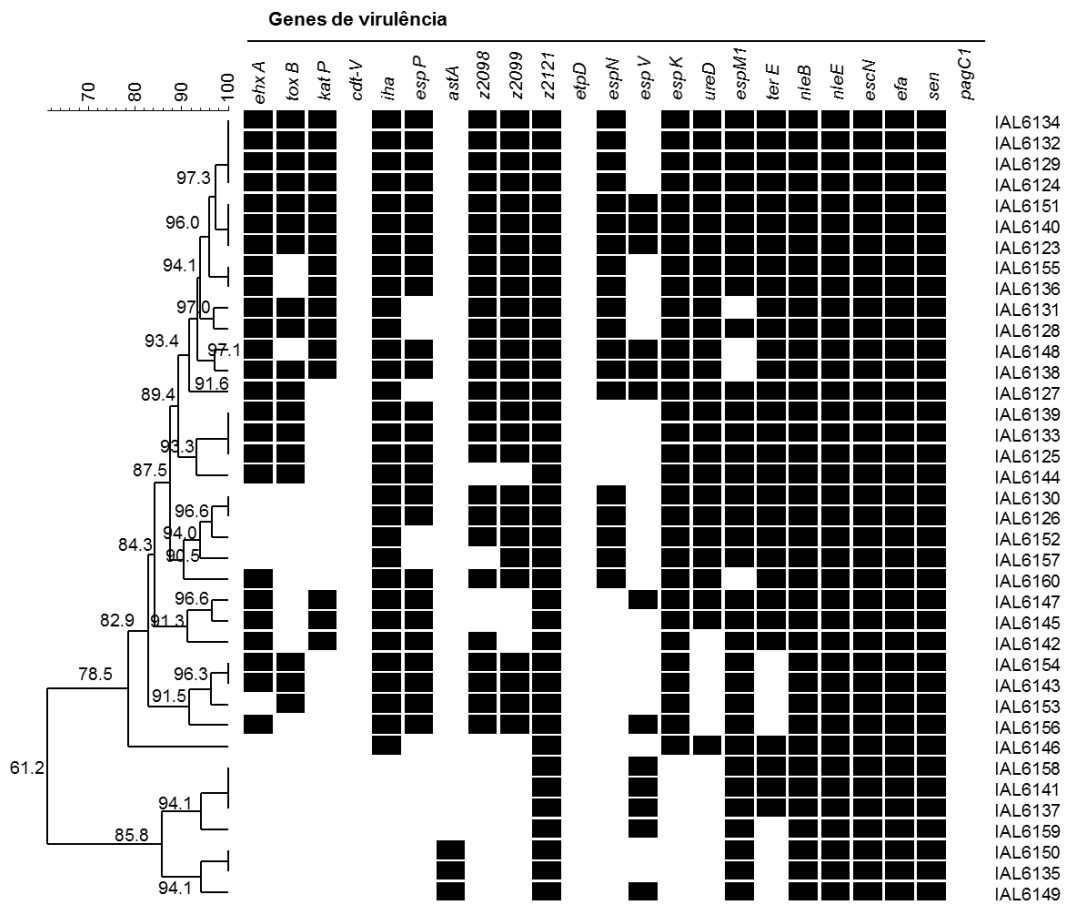
**Figura 10.** Distribuição dos genes *Z2098*, *Z2099*, *Z2121*, *ureD*, *espV*, *espK*, *espN* e *espM1* e *terE* associados às ilhas genômicas diversas, em cepas STEC e aEPEC do sorotipo O26:H11.

#### 4.4.4 Perfis de virulência

De acordo com a distribuição dos genes *ehxA*, *toxB*, *katP*, *cdt-V*, *iha*, *espP*, *astA*, *z2098*, *z2099*, *z2121*, *etpD*, *espN*, *espV*, *espK*, *ureD*, *espM1*, *terE*, *nleE*, *nleB*, *escN*, *efa*, *sen* e *pagC* marcadores genotípicos de virulência investigados dentre as cepas STEC e aEPEC O26:H11 neste estudo foi possível observar a ocorrência de oito perfis distintos de virulência para as STEC e 25 perfis distintos de virulência para as aEPEC. Os perfis associados ao grupo da STEC foram compostos por associações de marcadores que variaram de 14 a 19 genes. Para as aEPEC foram encontrados perfis cujo número de genes presentes variou de oito a 19. As figuras 11 e 12 ilustram os diversos perfis de virulência encontrados nos dois grupos de cepas O26:H11 estudadas.



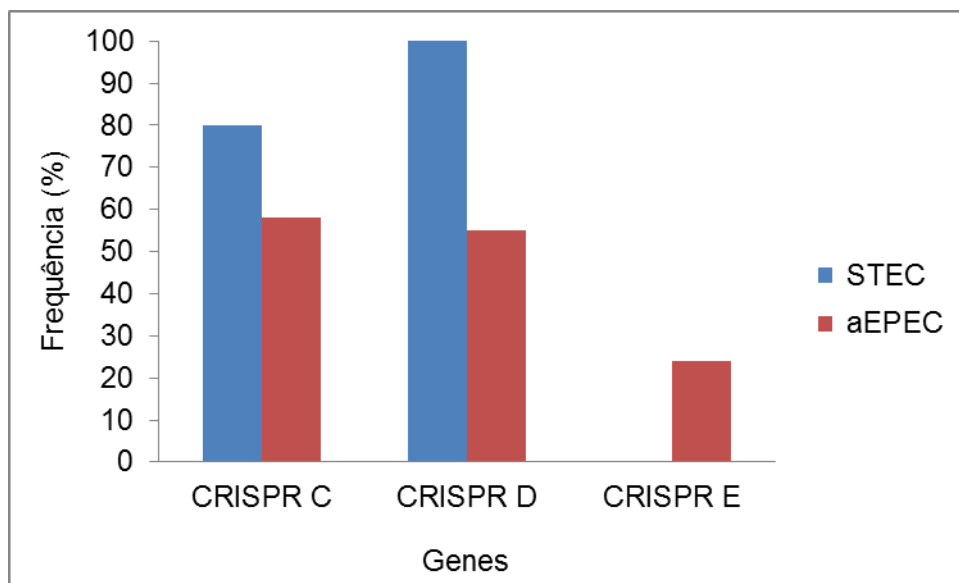
**Figura 11.** Dendrograma dos genes de virulência em cepas de STEC O26:H11.



**Figura 12.** Dendrograma dos genes de virulência em cepas de aEPEC O26:H11.

#### 4.5 Pesquisa de sequências CRISPR

As sequências CRISPR investigadas foram a SP\_O26\_C, a SP\_O26\_D e a SP\_O26\_E através da técnica de PCR real time utilizando-se dos primers e sondas descritos na tabela 8. O patotipo STEC apresentou as sequências CRISPR C e D nas frequências de oito (80%) e dez (100%) cepas respectivamente. Não foi observada a sequência CRISPR E em nenhuma amostra de STEC. Nas aEPEC foram observadas as três sequências CRISPR pesquisadas, sendo CRISPR C, D, E presentes em 22 (58%), 21 (55%) e nove (24%) cepas respectivamente. A sequência C apareceu como único marcador em três (8%) das aEPEC, enquanto que as sequências D e E foram únicas em quatro (11%) e seis (16%) cepas. A maioria das cepas 16 (42,10%) apresentaram as duas sequências CRISPR C e D, e duas (5%) aEPEC apresentaram a combinação das sequências C e E, e apenas uma cepa de aEPEC apresentou as três sequências C, D e E. A ausência do sequencial CRISPR foi observada em seis cepas.

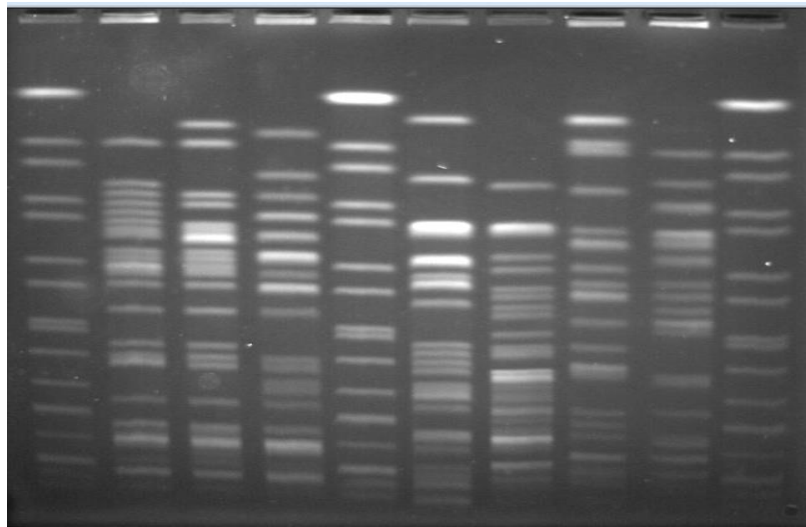


**Figura 13.** Perfis de polimorfismos associados aos *loci* CRISPR C, D e E, sorotipo-específicos em cepas de STEC e aEPEC O26:H11

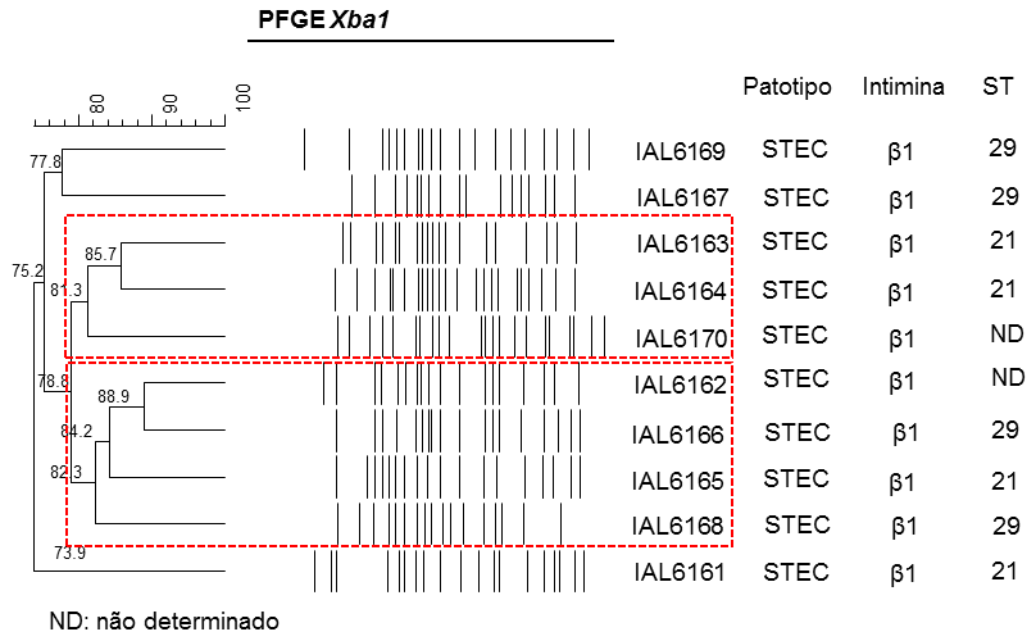
#### 4.6 Tipagem por eletroforese de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE)

De acordo com os ensaios de PFGE as cepas de STEC O26:H11 puderam ser classificadas em 10 pulsotipos distintos, com índices de similaridade genética variando de 71,9% a 88,9%, conforme ilustrado na Figura 14. Clusters bacterianos foram definidos a partir dos perfis de macrorestrição que apresentaram similaridade igual ou superior a 80%, e assim todas as STEC O26:H11 foram agrupadas em dois clusters distintos, contendo três e quatro cepas cada.

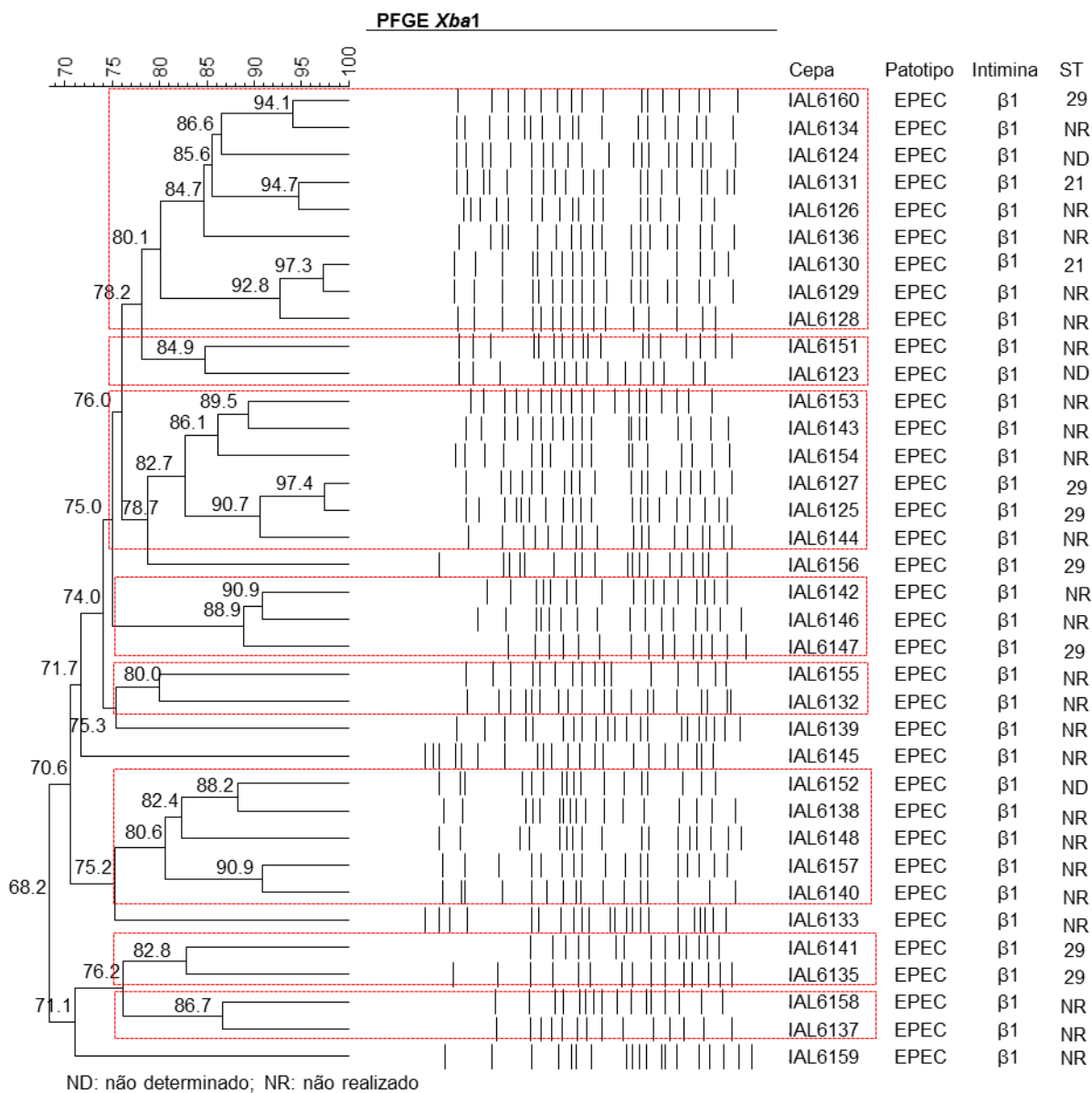
Dentre as aEPEC, das 38 cepas estudadas duas não puderam ser tipadas por PFGE devido a degradação do DNA durante o procedimento de extração. Portanto, foram analisadas 36 cepas para as quais foram encontrados 36 pulsotipos distintos, com índices de similaridade genética variando entre 68,2 e 97,4 (Figura 15). Empregando o mesmo critério em relação às STEC, para a definição de clusters bacterianos considerou-se um índice similaridade igual ou superior a 80%, e desta forma observou-se que as 38 aEPEC agruparam-se em oito clusters distintos.



**Figura 14.** Gel representativo do perfil de macrorestrição genômica de cepas STEC e aEPEC O26:H11 após digestão do DNA total com a enzima *Xba*I e corrida eletroforética em aparato de eletroforese de campo pulsátil.



**Figura 15.** Dendrograma ilustrando a similaridade genética entre cepas STEC O26:H11.



**Figura 16.** Dendrograma ilustrando a similaridade genética entre cepas aEPEC O26:H11.



#### 4.7 Tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos – *Multi Locus Sequence Typing* (MLST)

As análises por MLST envolveram todas as cepas STEC e 14 das cepas aEPEC. Pela impossibilidade de realizarmos a técnica de MLST em todas as 38 cepas de aEPEC estas foram selecionadas com base nos perfis de genes virulência plasmidiais *ehxA*, *katP*, *espP* e *etpD*, de modo que, dentre todos os perfis identificados o maior número possível deles pudesse ser representado. Sendo assim, das 24 cepas analisadas foi possível a definição de um Sequence Type (ST) válido de acordo com o banco de dados Enterobase para 18, sendo oito cepas STEC e 10 cepas aEPEC. No conjunto de cepas analisadas foram identificados apenas os STs 21 e 29, ambos pertencentes ao complexo clonal (CC) 29.

Nas STEC, os STs 21 e 29, foram encontrados igualmente em quatro destas cepas cada um. Dentre as aEPEC duas cepas apresentaram o ST21 e oito cepas apresentaram o ST29.

Seis cepas, sendo quatro aEPEC e duas STEC, não tiveram um ST válido identificado de acordo com o Enterobase. Isto ocorreu tanto em função da combinação específica dos sete genes analisados que não apresentou correlação com nenhuma das combinações já existentes no banco de dados, como em função da presença de possíveis formas alélicas novas para um dos genes analisados. A Tabela 12 resume o perfil de alelos obtidos para as cepas com ST indefinido.

**Tabela 11.** Tipagem pelo sequenciamento MLST e perfil de virulência das cepas de aEPEC e STEC do sorotipo O26:H11

<b>Cepa</b>	<b>Patotipo</b>	<b>Perfil de virulência</b>	<b>ST</b>
IAL6125	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espP, iha, sen, nleB, nleE, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6127	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, iha, escN, espK, espM1, espN, espV, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121,</i>	29
IAL6130	EPEC	<i>eae, efa, escN, espN, espK, espM1, espP, iha, nleB, nleE, sen, terE, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6131	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, escN, espK, espN, iha, katP, nleB, nleE, sen, ureD, terE, toxB, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6135	EPEC	<i>astA, eae, efa, escN, espM1, nleB, nleE, sen, z2121</i>	29
IAL6141	EPEC	<i>eae, efa, escN, espM1, espV, nleB, nleE, sen, terE, z2121</i>	29
IAL6147	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espP, espV, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, ureD, z2121</i>	29
IAL6149	EPEC	<i>astA, eae, efa, escN, espV, espM1, nleB, nleE, sen, z2121</i>	29
IAL6156	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, escN, iha, espK, espM1, espP, espV, nleB, nleE, sen, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6160	EPEC	<i>eae, efa, ehxA, escN, espK, espN, espP, iha, nleB, nleE, sen, terE, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6161	STEC	<i>stx2a, efa, ehxA, escN, espM1, espN, espP, espV, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6163	STEC	<i>stx1a, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espN, espP, espV, iha, katP, espP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6164	STEC	<i>stx1a, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espN, espP, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6165	STEC	<i>stx1a, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espP, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	21
IAL6166	STEC	<i>stx1a, efa, ehxA, escN, espK, espM1, espP, espV, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6167	STEC	<i>stx1a, efa, ehxA, escN, espK, espN, espM1, espP, espV, iha, katP, nleB, nleE, sen, terE, toxB, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6168	STEC	<i>stx1a, efa, escN, espK, espM1, espN, iha, nleB, nleE, sen, terE, ureD, z2098, z2099, z2121</i>	29
IAL6169	STEC	<i>stx1a, efa, escN, espK, espN, espM1, espV, iha, nleB, nleE, sen, z2098, z2099, z2121,</i>	29

**Tabela 12.** Perfis alélicos para os genes *adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* em cepas STEC e aEPEC O26:H11 sem definição de ST de acordo com o banco de dados Enterobase

<b>Cepa</b>	<b>Patotipo</b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gyrB</i></b>	<b><i>icd</i></b>	<b><i>mdh</i></b>	<b><i>purA</i></b>	<b><i>recA</i></b>
IAL6162	STEC	16	4	12	16	23	7	7
IAL6170	STEC	6	4	12	16	9	No match	144
IAL6152	aEPEC	514	4	12	16	9	7	7
IAL6150	aEPEC	88	24	12	16	9	7	7
IAL6123	aEPEC	88	24	49	35	17	11	91
IAL6124	aEPEC	514	4	12	16	9	7	7

## 5. Discussão

O sorogrupo O26 de *E. coli* está relacionado às aEPEC e STEC, sendo que as primeiras constituem causa comum de diarreia aguda infantil e as segundas são responsáveis por causar doenças mais severas como colite hemorrágica e a SHU (Tarr et al., 2005a). As STEC O26 fazem parte do chamado '*big six*' termo este empregado para designar os sorogrupos não-O157 de STEC mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico em diversas partes do mundo, como na Europa (EFSA, 2015), nos Estados Unidos (Ison et al., 2015) e na Austrália (Lajhar et al., 2017). No ano de 2015, segundo o European Food Safety Authority (EFSA) e o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), a ocorrência de sorogrupos não-O157 de STEC associados ao *big six*, especialmente do sorotipo O26:H11, foi quase proporcional ao número de casos de STEC O157:H7 no continente europeu (EFSA and ECDC, 2015).

No Brasil o primeiro caso de SHU com confirmação laboratorial foi causado pelo sorotipo O26:H11, tendo sido descrito por Guth et al., (2002). Posteriormente, estudos mostraram que este sorotipo de EHEC foi o segundo mais prevalente no estado de São Paulo em uma análise envolvendo cepas de STEC isoladas entre os anos de 1970 e 1999 (Vaz et al., 2004).

Cepas de STEC, especialmente as do sorotipo O26:H11, estão constantemente sujeitas a sofrerem modificações genéticas que envolvem tanto o ganho como a perda de genes associados a virulência, incluindo os genes *stx*. Bielaszewska et al. (2007a) demonstraram uma alta taxa de excisão fágica envolvendo os genes *stx* em isolados de *E. coli* O26:H11, fazendo com que estes isolados originalmente pertencentes ao patotipo STEC, com poucos repiques em laboratório se tornassem geneticamente compatíveis com aEPEC. Com o advento das ferramentas moleculares, especialmente do sequenciamento de genoma total, ficou evidente que uma considerável parcela de clones de *E. coli* do sorotipo O26:H11 apresentam um background filogenético do patotipo STEC, independente de serem no momento do diagnóstico laboratorial classificados como STEC ou aEPEC.

O Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz recebe cepas de *E. coli* para identificação de patotipo diarreiogênico e sorotipo de diversas partes do Brasil, e dentre estas cepas nos últimos anos observamos a ocorrência frequente de isolados de aEPEC O26:H11, assim como alguns isolados de STEC do mesmo sorotipo. Em função da importância epidemiológica atribuída ao sorotipo O26:H11 enquanto STEC e de relatos prévios sobre o fato de que muitas das cepas aEPEC O26:H11 constituem-se em clones derivados das STEC (Bielaszewska et al., 2007b) este estudo foi proposto com o intuito principal de caracterizar mais detalhadamente o background genético associado à virulência em cepas STEC e aEPEC O26:H11 isoladas em diversas regiões do Brasil. Uma análise comparativa das características encontradas em ambos os grupos foi realizada com o intuito de elucidar se, a exemplo do que ocorre em outros países, as aEPEC em nosso meio estão mais relacionadas ao patotipo STEC, ou de fato tem uma origem mais próxima do patotipo EPEC.

A subtipagem do gene *stx* das cepas de STEC O26:H11 demonstrou que a maioria delas foi portadora do subtipo *stx1a*, tendo sido este subtipo encontrado em sete das cepas de origem humana e em uma cepa proveniente de alimento. As STEC portadoras de *stx1a* são, segundo a literatura, associadas a formas clínicas mais brandas de doença, embora já tenham sido causadoras de quadros clínicos graves com evolução para SHU (Zhang et al., 2007; Pollock, et al., 2011), o que significa que seu potencial de causar doenças exacerbadas não deve ser menosprezado.

Duas das STEC O26:H11 deste estudo apresentaram o genótipo *stx2a*, sendo ambas isoladas do Estado de São Paulo nos anos de 2006 e 2017. Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de STEC O26:H11 albergando o genótipo *stx2a* no Brasil. Este achado tem grande importância, pois clones de STEC O26:H11 carreando os genes *stx2* apenas são considerados altamente virulentos e os hospedeiros humanos infectados por tais patógenos estão mais propensos a desenvolverem SHU (Fraser et al., 2004; Bielaszewska et al., 2013).

Até meados dos anos 90, as STEC O26:H11 eram em sua maioria portadoras de *stx1a* apenas ou deste subtipo associado ao subtipo *stx2a*. O mesmo padrão de genótipo foi observado no Brasil de acordo com estudos epidemiológicos anteriores

envolvendo o patótipo STEC, onde houve a descrição da ocorrência do sorotipo O26:H11 (Vaz et al., 2004) assim como nos EUA, Japão, Bélgica e Argentina, onde as cepas caracterizadas foram em sua maioria portadoras de apenas *stx1a*. Entretanto, no final dos anos 90 Bielaszewska et al. descreveram a emergência de um clone O26:H11 portador de *stx2a* apenas e responsável por um grande número de casos de SHU na Alemanha (Bielaszewska et al., 2013). Este clone, que foi denominado de “clone alemão”, disseminou-se a partir da Alemanha pelo continente europeu, EUA e América do Sul, e passou a ser frequentemente isolado em diversos países.

A partir do ano de 2010 surgiu na França um novo clone de STEC O26:H11, portador apenas do genótipo *stx2d*, responsável por causar casos graves de infecção, em sua maioria com evolução para SHU (Delannoy et al., 2015). Este clone foi denominado “clone francês”, e segundo alguns estudos sua ocorrência em humanos não havia até então sido relatada, existindo apenas poucos relatos de isolamento a partir de amostras de queijo e de gado (Miko et al., 2010). A gravidade dos quadros clínicos associados aos clones alemão e francês de STEC O26:H11 fez com que autoridades de saúde e de vigilância sanitária de diversos países europeus passassem a considerar os isolados de STEC O26:H11 portadores apenas de *stx2* patógenos tão relevantes quanto as STEC O157:H7, e o seu monitoramento tornou-se, e é até os dias atuais, uma prioridade em Saúde Pública. Desta forma, com evidente introdução de clones O26:H11 portadores de *stx2a* no Brasil, a partir do ano de 2007, associados a quadros de diarreia aguda, as ações de vigilância precisam ser ainda mais estimuladas, a fim de que seja possível a detecção destes patógenos de forma precoce, minimizando possíveis impactos negativos à Saúde Pública.

Os ensaios de citotoxicidade empregando células Vero cultivadas *in vitro* permitiram verificar a capacidade de expressão dos genes *stx* e de secreção da forma biologicamente ativa da toxina de Shiga em todas as cepas identificadas por PCR como STEC O26:H11 (Beutin et al., 2007, 2008). Este teste fenotípico é considerado o ‘padrão-ouro’ para o diagnóstico de infecções por STEC, e permite inferir o potencial patogênico de um dado isolado bacteriano portador do gene *stx* com base no título de citotoxicidade expresso, quando o ensaio além de qualitativo é também quantitativo

(Paton et al., 1998). Em nosso estudo realizamos apenas uma análise qualitativa, embora tenha sido possível detectar visualmente um nível superior de lise e de destruição do tapete celular induzido pelas duas cepas portadoras de *stx2a*, quando comparadas às cepas que albergavam *stx1a*, confirmando assim a atividade biológica mais potente associada a *Stx2a*.

A adesina intimina, que é codificada pelo gene *eae*, estando este gene localizado na ilha de patogenicidade *LEE*, é responsável pela lesão A/E nas células epiteliais intestinais (Hazen et al., 2013). O locus *LEE* é um elemento genético compartilhado entre diversos sorotipos de STEC, incluindo o O26:H11 e as aEPEC. A ocorrência concomitante dos genes *stx* e *eae* em seu estado funcional em *E. coli* é um marcador de prognóstico clínico desfavorável pois está associada a uma evolução mais frequente para SHU nas infecções por STEC, e caracteriza dentro deste patotipo o subgrupo das EHEC (Fruth et al., 2015). Em nosso estudo, embora todas as STEC O26:H11 fossem portadoras de *eae*, algo já esperado, não pudemos fazer nenhum tipo de correlação entre a ocorrência deste gene, os genótipos de *stx* e os quadros clínicos dos pacientes dos quais as cepas foram isoladas, uma vez que em nossos registros não haviam informações clínico-epidemiológicas suficientes para tais correlações. É oportuno registrar que o laboratório ao receber uma solicitação de investigação nem sempre dispõe de registros adequados para fazer correlações clínico-epidemiológicas-laboratoriais nos estudos que realizam, fato este que limita a interpretação posterior dos resultados de estudos como este que realizamos. Apesar das poucas informações clínico-epidemiológicas disponíveis nenhum dos casos de infecção por STEC O26:H11 neste estudo foram associados a quadros de SHU, embora uma das cepas estudadas, portadora de *stx1a*, tenha sido isolada a partir de um paciente com diarreia sanguinolenta.

A pesquisa do subtipo alélico do gene *eae* revelou a ocorrência de *eae*  $\beta$ 1 em todas as cepas O26:H11, independente de terem sido classificadas como STEC ou aEPEC. Este resultado foi semelhante ao reportado por Fierz et al. (2017) e Bibbal et al. (2014), descrevendo a presença apenas da intimina  $\beta$ 1 no sorotipo O26:H11. Estudos demonstraram a existência de correlação entre os sorotipos e os subtipos de intimina no patotipo STEC. Por exemplo, enquanto as STEC O26:H11 apresentam o subtipo *eae*  $\beta$ 1,

nos sorotipos O157:H7 and O145:H28 são encontrados os subtipos *eae*  $\gamma$ 1 (Oswald et al., 2000). Deste modo, a subtipagem do gene *eae* é uma ferramenta útil na caracterização de cepas patogênicas de *E. coli*. É sabido que os diferentes subtipos de intimina das *E. coli* patogênicas podem apresentar tropismo por diferentes sítios anatômicos do hospedeiro humano, e com base neste conhecimento a pesquisa tem buscado explorar esta peculiaridade no desenvolvimento de vacinas que possam prevenir a adesão bacteriana nos processos de infecção, e com isso se não impedir totalmente, ao menos minimizar os danos causados pela bactéria ao interagir com o hospedeiro.

Um dos principais objetivos do presente estudo foi realizar a pesquisa de um amplo conjunto de genes que são responsáveis pela produção de fatores de virulência diversos como outras toxinas, adesinas, proteínas efetoras e proteínas autotransportadoras. Estes fatores de virulência são considerados elementos acessórios na patogenicidade de cepas pertencentes principalmente aos patotipos STEC e aEPEC e embora para alguns deles o papel exato no processo infeccioso ainda não esteja claramente definido é consenso na literatura que a sua ocorrência em clones envolvidos em infecções humanas pode trazer consequências mais graves ao organismo do hospedeiro (Bugarel 2011; Delannoy et al., 2013a, 2013b). Observamos uma alta frequência de alguns dos genes investigados, como *ehx*, *espP*, e *iha*, especialmente dentre as cepas classificadas como STEC, evidenciando, portanto, o seu potencial de causar doenças graves. Entre as aEPEC merece destaque a alta frequência com que os genes *ehx* e *espP*, associados a produção da enterohemolisina de EHEC e da serino-protease EspP, respectivamente, foram observados. Estes genes costumam ser encontrados em um plasmídeo de alta massa molecular associado à maior virulência em cepas do patotipo STEC classificadas como EHEC, portanto a presença dos marcadores *ehx* e *espP* em mais da metade das aEPEC analisadas neste estudo sugere que estas cepas podem albergar o plasmídeo de virulência de STEC/EHEC, e reforçam a hipótese de que as aEPEC O26:H11 analisadas neste estudo são derivadas de clones de STEC/EHEC. Há outros relatos na literatura semelhantes aos achados deste estudo no que se refere à ocorrência de genes associados ao plasmídeo de virulência de STEC/EHEC em cepas classificadas como aEPEC (Brunner et al., 1999; Zhang et al., 2000b; Bielaszewska et al., 2005), sendo assim



ossos resultados somam-se a estes relatos anteriores demonstrando haver em nosso meio uma subpopulação de cepas de aEPEC O26:H11 com características de virulência de STEC/EHEC, pelo menos no que se refere aos determinantes associados ao plasmídeo de virulência de STEC/EHEC.

Dentre os genes relacionados à capacidade de adesão, além do gene *eae*, o gene responsável pela produção da adesina Iha foi o mais frequente, tendo ocorrido em todas as cepas STEC e em 80% das cepas de aEPEC, sugerindo que este gene pode ser um fator importante no processo de adesão das cepas O26:H11. É importante destacar que não foram realizados ensaios fenotípicos de adesão nas cepas em estudo, tão pouco foi investigado a expressão de *iha* nestas, sendo, portanto, esta hipótese proposta apenas uma especulação. As sequências associadas aos genes *etpD* e *cdt-V* não foram encontradas em nenhuma das cepas estudadas, confirmando o fato de que estes genes costumam ser marcadores mais associados a subpopulações específicas, como o sorotipo O157:H7 de STEC no caso do primeiro, e alguns sorotipos de STEC desprovidos de *eae* no caso de *cdt-V* (Bielaszewska et al., 2004).

Os genes *efa*, *nleB*, *nleE*, *pagC* e *sen* pertencem a ilha genômica OI-122, sendo esta encontrada com frequência em cepas STEC envolvidas em grandes surtos de diarreia e com a capacidade de causar doenças severas com evolução para SHU (Karmali et al., 2003; Wickman et al., 2006). Sendo assim, a ocorrência destes genes pode ser considerada como um marcador de alta virulência para o patótipo STEC, e segundo Bielaszewska cepas classificadas como aEPEC e portadoras de genes da OI-122 podem ser consideradas geneticamente relacionadas às STEC (Bielaszewska et al., 2007c).

A OI-122 apresenta uma organização estrutural composta por três módulos distintos: no primeiro módulo encontra-se *pagC*, no segundo módulo *sen*, *nleB* e *nleE*, e no terceiro módulo *efa* (Koncsy et al., 2008). Além disso, a presença dos genes *eae/escN* é mandatória para que os efetores *nleB* e *nleE* possam atuar, o que implica em uma dependência funcional entre a OI-122 e o locus *LEE*, e de acordo com a literatura, apenas os isolados bacterianos portadores dos três módulos da OI-122 seriam altamente virulentos (Deng et al., 2004; Kelly et al., 2006). Entretanto, é comum a ocorrência de cepas de aEPEC apresentando formas incompletas da OI-122, sendo a forma completa desta

ilha mais estatisticamente associada às cepas STEC (Karmali et al., 2003). Entretanto o padrão de ocorrência observado para os genes associados à OI-122 em nosso estudo demonstrou que todas as cepas independentemente do patotipo carregavam a forma incompleta da OI-122, já que todas foram negativas para *pagC*. Estes achados sugerem que não houve diferença no potencial de patogenicidade entre as STEC O26:H11 e as aEPEC envolvidas neste estudo. Dentre as STEC um dos isolados, conforme mencionado anteriormente foi associado a um caso de diarreia sanguinolenta, podendo indicar que outros fatores de virulência, além da presença desta ilha podem estar implicados na doença. Por outro lado, de acordo com nossos registros nenhuma das aEPEC O26:H11 analisadas foi associada a quadros complicados de diarreia, confirmando os dados da literatura que associam apenas a OI-122 completa a uma maior probabilidade de doenças graves.

Dentre os diversos genes acessórios de virulência investigados no presente estudo a pesquisa de genes marcadores para ilhas genômicas OI-57, OI-44, OI-50 e OI-71 foi proposta por terem estes genes sido anteriormente considerados de alta especificidade para cepas de EHEC e na detecção de cepas de aEPEC associadas às EHEC, que assumiram a condição de aEPEC em função da perda de *stx* (Bugarel et al., 2011a). Foi possível observar que os marcadores *z2098*, *z2099*, *z2121*, *ureD* e *terE* ocorreram em todas as cepas STEC O26:H11, as quais também apresentaram altas frequências para os genes *espM1* e *espK* e *espN*. Resultados semelhante para cepas do patotipo STEC associadas a casos graves de infecção humana foram encontrados por Douëllou et 2017 ao analisar os genes *espK*, *espV*, *ureD* e o *z2098*, e por Delannoy et al., 2013 ao analisar os genes *z2098*, *espK* e *ureD*. Estes autores sugeriram o uso destes genes para complementar a avaliação do potencial de virulência de cepas de STEC/EHEC e na identificação de clones com capacidade aumentada de causar doenças mais graves e SHU. Outros estudos também confirmaram a ocorrência em maior frequência dos genes mencionados em cepas de STEC/EHEC do sorogrupo O157 e dos sorogrupos que compõem o big six, incluindo STEC O26:H11, além disso, um estudo conduzido por Delannoy et al., 2016 demonstrou que combinações dos genes *espK*, *espV*, *ureD*, e *z2098*, possuem alta especificidade na identificação de cepas

STEC/EHEC isoladas a partir de produtos cárneos e carne in natura, associadas especificamente a sorogrupos do big six.

Com relação às aEPEC O26:H11 os marcadores citados também foram encontrados, porém em menor frequência, exceto pelos genes *espK* e *espM1* que neste grupo foram observados em frequência superior a 82%. Neste sentido, de modo similar aos achados deste estudo Delannoy et al. (2013) também demonstraram a ocorrência de *espK* e *espM1* entre cepas aEPEC O26:H11, sugerindo que estes genes, mais particularmente o gene *espK* podem ser considerados marcadores fidedignos para identificação de clones de aEPEC O26:H11 derivados do patotipo STEC. De um modo geral, a demonstração sobre a ocorrência de genes das ilhas OI-57, OI-44, OI-50 e OI-71 altamente específicos das EHEC em cepas de aEPEC, particularmente no sorotipo O26:H11, poderá ser explorada para fins de avaliação de risco microbiológico, uma vez que a presença de cepas de aEPEC portadoras destes marcadores pode indiretamente ser um indicativo da presença de cepas de EHEC tanto em amostras clínicas como em amostras de origem não humana.

As sequências CRISPR são elementos presentes no genoma de diversas espécies de bactérias do domínio Bacteria e em praticamente todos os componentes do domínio Archaea (Sorek et al., 2008). Embora sua função exata não seja totalmente conhecida é postulado que estas sequências atuam como uma espécie de sistema imune adaptativo de bactérias, protegendo-as contra tentativas de ataques por parte de bacteriófagos e alguns transposons.

Todas as sequências CRISPR apresentam uma organização estrutural semelhante, sendo formadas por repetições de 20 a 40 nucleotídeos que são separadas entre si por sequências denominadas espaçadores (spacers), cuja extensão é também de 20 a 40 nucleotídeos. É a composição e o número específico destes espaçadores presentes em uma dada espécie que tornam as sequências CRISPR comparáveis a impressões digitais bacterianas. Além das repetições de nucleotídeos e dos espaçadores geralmente o gene *cas*, responsável pela produção da proteína Cas, encontra-se associado às sequências CRISPR, o que fez com que o seu uso fosse inicialmente voltado para processos de edição gênica através do fenômeno de

interferência de RNA (Garcia-Gutiérrez et al. 2015). Entretanto, estudos mais detalhados sobre a filogenia das sequências CRISPR demonstraram que os arranjos CRISPR/Cas tendem a se manter conservados em termos de composição em uma mesma espécie bacteriana e em muitos casos, como no caso de *E. coli* esse espectro de conservação se dá em nível de sorotipo.

Desta forma, surgiu a ideia de explorar as sequências CRISPR como marcadores genotípicos para alguns sorotipos de *E. coli* dentre eles os sorotipos de STEC que compõem o big six, incluindo as STEC O26:H11. Com base na análise do genoma total de duas cepas de STEC/EHEC O26:H11 Delannoy et al (2012; 2015) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real para a detecção de três polimorfismos distintos associados às sequências CRISPR presentes nas cepas sequenciadas: SP\_O26\_C, SP\_O26\_D e SP\_O26\_E. Partindo do pressuposto de que a especificidade do ensaio de PCR na identificação de cepas STEC/EHEC O26:H11 foi satisfatoriamente demonstrada pelos autores mencionados, neste estudo realizamos a pesquisa dos polimorfismos SP\_O26\_C, SP\_O26\_D e SP\_O26\_E com o intuito principal de verificar sua ocorrência em cepas STEC e aEPEC O26:H11 isoladas em nosso meio, as quais por sua vez apresentam interações com o hospedeiro e com o próprio ambiente distintas das cepas STEC/EHEC O26:H11 empregadas como base para o desenvolvimento dos testes de PCR.

De um modo geral observamos, a exemplo do que foi relatado anteriormente, a presença dos polimorfismos SP\_O26\_C e/ou SP\_O26\_D em todas as cepas STEC, sendo o último detectado isoladamente em todas estas cepas o que indica que este polimorfismo específico constitui-se em marcador genotípico com grande potencial a ser explorado em tentativas futuras de implementar melhorias na detecção molecular de cepas STEC O26:H11. Nenhuma das cepas STEC apresentou o polimorfismo SP\_O26\_E, sendo este resultado compatível com o que relata a literatura, uma vez que este tipo de polimorfismo foi especificamente associado ao clone francês de STEC O26:H11, que é portador do genótipo *stx2d* (Delannoy et al., 2015) e nenhuma das cepas STEC O26:H11 deste estudo foi portadora de tal genótipo.

Com relação às aEPEC observamos uma distribuição mais heterogênea das sequências CRISPR, pois além da presença dos tipos SP\_O26\_C e SP\_O26\_D associados

ou não em mais da metade destas cepas, neste grupo também foi possível a detecção do polimorfismo SP\_O26\_E, em cerca de 25% das cepas estudadas. Sobre este achado, é importante mencionar que dentre as aEPEC portadoras da sequência CRISPR SP\_O26\_E seis albergaram este polimorfismo como o único dentre os três pesquisados. De acordo com estudos prévios a ocorrência unicamente do polimorfismo CRISPR SP\_O26\_E foi associada apenas à circulação ao clone francês de STEC O26:H11 (Delannoy et al., 2015). A fim de melhor compreendermos este resultado e fazermos inferências válidas realizamos uma análise dos perfis de genes associados apenas ao plasmídeo de virulência de STEC nestas seis cepas portadoras de CRISPR SP\_O26\_E, tendo verificado que três destas cepas não apresentaram a presença dos genes *ehx*, *katP*, *espP* e *etpD*, característica esta também compatível com clone francês. O conjunto destes achados nos leva a suspeitar fortemente que estas três aEPEC O26:H11 portadoras de CRISPR SP\_O26\_E representam isolados geneticamente associados ao clone francês de STEC O26:H11 que podem ter sofrido excisão fágica, ou alternativamente possuem um background genético apto a receber especificamente o fago carreador de *stx2d*. Estas três cepas são certamente candidatas a análises mais aprofundadas no futuro. Em um estudo anterior Bugarel et al (2011) demonstraram que é possível a ocorrência de segmentos incompletos dos fagos associados a Stx nos seus sítios preferenciais de inserção em cepas aEPEC O26:H11, assim como a presença de formas truncadas dos genes *stx*, incapazes de produzir uma toxina biologicamente funcional. Abordagens deste tipo poderão confirmar futuramente as hipóteses por ora propostas para explicar os resultados obtidos em relação aos três isolados de aEPEC portadores de CRISPR SP\_O26\_E e com perfil de genes plasmidiais compatível com o clone francês de STEC O26:H11.

Uma vez que dentre as cepas de STEC e aEPEC O26:H11 analisadas não havia nenhuma evidencia de link epidemiológico, a tipagem por PFGE foi realizada neste estudo com o intuito de avaliar a extensão da diversidade genética dos isolados brasileiros e investigar a possível circulação de clones específicos dentro do sorotipo O26:H11. Em relação ao primeiro objetivo pudemos constatar que, a exemplo do que já foi reportado em outros estudos, o sorotipo O26:H11 associado a isolados brasileiros é

composto por uma diversidade de clones. Dentre as 10 cepas STEC analisadas nenhuma apresentou similaridade genética de 100% entre si, ou mesmo superior a 90%. Curiosamente as duas cepas de STEC com genótipo *stx2a* agruparam-se em clusters genéticos diferentes, sugerindo uma baixa identidade genética entre si. É válido mencionar que estas cepas foram isoladas de origens distintas, e apresentaram perfis de virulência distintos também, especialmente em relação aos genes plasmidiais. Sendo assim, em relação ao segundo objetivo proposto para realização dos ensaios de PFGE, neste estudo não foram observados clones específicos de STEC O26:H11 disseminados em nosso meio. Uma possível limitação em relação a esta análise é certamente o baixo número de cepas estudadas. Quanto às aEPEC houve também considerável diversidade, entretanto neste caso aproximadamente 30% das cepas apresentou similaridade genética superior a 90%, sugerindo que neste grupo pode haver a existência de alguns clones específicos e aparentemente mais estáveis do ponto de vista genético do que as STEC. Ainda que os registros epidemiológicos disponíveis não nos permitam fazer inferências concretas é possível especular que estas cepas de aEPEC apresentando alta similaridades podem ter sido associadas a pequenos surtos diarreia não notificados ao sistema de vigilância epidemiológica.

A tipagem de patógenos bacterianos pela técnica de MLST tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na investigação das relações clonais e filogenéticas entre cepas de diferentes origens e isoladas em diferentes regiões geográficas. Embora esta técnica não seja altamente discriminatória como o PFGE, sua vantagem reside no fato de que por empregar o sequenciamento como ferramenta de análise, comparações de resultados entre pesquisadores do mundo inteiro quando estes empregam o mesmo conjunto de genes são possíveis, e de forma inequívoca. Além disso, a técnica se mostra mais apropriada para patógenos onde há a ocorrência frequente de processos de recombinação genética em função da plasticidade genômica, característica esta marcante no gênero *Escherichia*, especialmente na espécie *E. coli*. Atualmente existem três esquemas de tipagem por MLST para *E. coli*: o esquema proposto por Thomas Whittam, cujo banco de dados é gerido pela Universidade do Estado de Michigan, o esquema proposto por Sylvain Brisse and Erick Denamur, cujo banco de

dados encontra-se sob a gestão do Instituto Pasteur da França, e o esquema proposto por Mark Achtman, gerenciado pela Escola Médica de Warwick (Warwick Medical School). Este último é atualmente o mais empregado nos estudos diversos sobre *E. coli* diarreio gênica, e conta com o mais numeroso banco de STs disponível. Por este motivo, o esquema de Achtman foi escolhido para os ensaios de MLST realizados nesse estudo, que não envolveram a totalidade dos isolados, mas uma parcela destes, selecionada com base nos distintos perfis de virulência, de modo que cada um dos perfis identificados pudesse ser representado. De acordo com os resultados que obtivemos dentre as cepas de *E. coli* O26:H11 tipáveis por MLST pudemos evidenciar a presença de apenas dois STs, o ST21 e o ST29. Nossos resultados estão de acordo com a literatura em relação às cepas STEC, para as quais, a maioria dos trabalhos já publicados usando o mesmo esquema de MLST descreve a ocorrência dos STs 21 e 29 neste sorotipo, ambos pertencentes ao CC29 (Bielaszewska et al., 2013; Zweifel et al., 2013; Delannoy et al., 2015). Entretanto, em relação às aEPEC a presença dos STs 21 e 29, especialmente do último que foi encontrado na maioria das cepas, está associada apenas a clones que possuem uma origem filogenética proveniente do patotipo STEC. Por este motivo, a tipagem por MLST, juntamente com os demais resultados sobre a presença de marcadores de virulência altamente específicos de STEC e das seqüências CRISPR fornecem evidências contundentes de que as a maioria das aEPEC O26:H11 isoladas de infecções humanas no Brasil representam clones de STEC deste sorotipo excisados dos fagos *stx*, confirmando assim uma das hipóteses iniciais deste estudo.

Dentre as cepas que foram selecionadas para a tipagem por MLST seis não puderam ter o ST definido em função da inexistência no banco de dados Enterobase de STs compatíveis com as combinações específicas para os sete genes housekeeping que estas cepas apresentaram, isso no caso de cinco cepas, e devido a inexistência da forma alélica identificada para o gene *purA* em uma das cepas, sendo esta o isolado portador de *stx2a*. Estas cepas representam novos STs dentro do sorotipo O26:H11, sendo a ocorrência de novos STs neste sorotipo em particular de grande interesse, pois a grande maioria das cepas O26:H11 até o

momento descritas pertencem aos STs 21 ou 29. Entretanto para a determinação destes novos STs é necessária a realização do sequenciamento do genoma total, pois o sequenciamento de Sanger não é aceito para este propósito pela curadoria da Warwick Medical School.

Dentre as cepas associadas a novos STs, três, uma portadora de *stx1a* e duas portadoras de *eae*, constituem-se em single locus variantes (SLV) do ST 21, o que indica que estes isolados possivelmente estão associados ao mesmo complexo clonal do ST21, o CC29. Por outro lado, as demais cepas diferiram dos STs 21 e 29 em pelo menos dois genes, demonstrando pouca relação filogenética com estes STs. Desta forma, podem ser de fato consideradas novas linhagens clonais. Análises mais robustas como o sequenciamento de genoma total serão imprescindíveis para elucidar de modo satisfatório a origem destes clones.

Os dados obtidos com a realização deste estudo demonstraram que as STEC O26:H11 circulantes no Brasil apresentam características de alta virulência, ainda que a maioria destas seja portadora de um genótipo de *stx* menos associado a capacidade de causar quadros clínicos graves no hospedeiro humano. Além disso, foi possível descrever e caracterizar pela primeira vez no Brasil a ocorrência de clones de STEC O26:H11 portadores do genótipo *stx2a*. Pelo conjunto de resultados associados a estes isolados *stx2a* concluímos que pelo menos um deles guarda semelhanças com o clone europeu de STEC O26:H11. Com relação ao outro isolado *stx2a*, de acordo com as características que este apresentou não foi possível associá-lo a nenhum dos clones atualmente descritos para as STEC O26:H11, indicando que este pode ser um clone cuja presença está relacionada a uma região geográfica específica, no caso o Brasil ou a América do Sul.

Uma das mais importantes contribuições deste estudo em relação ao que já havia sido descrito em análises anteriores sobre as aEPEC O26:H11 em nosso meio, foi demonstrar a presença de elementos CRISPR altamente específicos do soropatotipo STEC O26:H11 nestas cepas, que associados a tipagem por MLST e a presença de marcadores genotípicos como os genes da ilhas OI-57 e *espK* as caracterizam definitivamente como derivadas das STEC O26:H11. Entretanto, assim como ocorreu



com as STEC, algumas cepas de aEPEC não tiveram um ST definido, abrindo a perspectiva sobre a necessidade de análises mais aprofundadas no futuro sobre este relevante sorotipo de *E. coli* para o hospedeiro humano.

## 6. Conclusões

- As cepas de STEC O26:H11 isoladas no Brasil apresentam características de alta virulência, embora a maioria destas sejam portadoras do genótipo *stx1a* que, segundo a literatura, estão associadas com doenças clínicas mais brandas.
- Foram descritas e caracterizadas pela primeira vez no Brasil cepas STEC O26:H11 portadoras do genótipo *stx2a*, que são consideradas pela literatura cepas altamente virulentas e capazes de levar hospedeiros humanos ao desenvolvimento de SHU.
- Cepas aEPEC O26:H11 isoladas no Brasil apresentam marcadores genéticos altamente específicos das STEC O26:H11 como genes das ilhas OI-57 e sequências CRISPR, demonstrando que são derivadas do patótipo STEC.
- Embora a tipagem por PFGE tenha revelado considerável diversidade genética entre as STEC e aEPEC O26:H11, as análises por MLST confirmaram uma origem filogenética comum para a maioria das cepas investigadas.
- Dentre as cepas STEC e aEPEC avaliadas por MLST algumas não tiveram um ST definido, indicando que podem pertencer a Sequences Types ainda não descritos para o sorotipo O26:H11.

## 7. Referências bibliográficas

Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2003;52(11):1015–9.

Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol* 2004;53(11):1137–44.

Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L et al. Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44(10):3703–11.

Bai X, Fu S, Zhang J, Fan R, Xu Y, Sun H et al. Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Sci. Rep* 2018; 8: 1–11.

Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F et al. *Escherichia coli* H-Genotyping PCR: a Complete and Practical Platform for Molecular H Typing. Ledebor NA, organizador. *J Clin Microbiol* 2018;56(6):1–13.

Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista. Frequência laboratorial e resistência antimicrobiana de enteropatógenos bacterianos isolados em crianças na primeira infância na região do ABC Paulista, 2015 – 2016. Edição 182. São Paulo; 2019.

Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, et al. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989; 27(11): 2559-2564.

Beutin L, Stefan K, Herold S, Oswald E, Schmidt H. Genetic Analysis of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serogroup O103 Strains by Molecular Typing of Virulence and Housekeeping Genes and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(4): 1552-1563.

Beutin L, Steinruck H, Krause G, Steege K, Haby S, Hultsch G, Appel B. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol* 2007; 102:630–639.

Beutin L, Kruger U, Krause G, Miko A, Martin A, Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2e producing *Escherichia coli* present in food, pigs and in the environment as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:4806–4816.

Beutin L, Jahn S, Fach P. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *J Appl Microbiol* 2009;106(4):1122–32.

Bibbal D, Loukiadis E, Kérourédan M, Garam PC, Ferré F, Cartier P et al. Intimin Gene (*eae*) Subtype-Based Real-Time PCR Strategy for Specific Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in Cattle Feces. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(3):1177–84.

Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tscha H, et al. Characterization of Cytotoxic Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing. *Microbiology* 2004;72(3):1812–6.

Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, Sonntag A-K, Karch H. Molecular Profiling and Phenotype Analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: Secular and Geographic Consistency of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4225–8.

Bielaszewska M, Prager R, Kock R, Mellmann A, Zhang W, Tschape H et al. Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection in Humans. *Appl Environ Microbiol* 2007a;73(10):3144–50.

Bielaszewska M, Köck R, Friedrich A.W, von Eiff C, Zimmerhackl LB, Karch H et al. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: Time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One* 2007b;2(10):1-8.

Bielaszewska M, Sonntag AK, Schmidt MA, Karch H. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes Infect* 2007c; 9: 891–897

Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis* 2013;56(10):1373–81.

Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, et al. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 2004;7(4):269–76.

Brandal LT, Sekse C, Lindstedt B-A, Sunde M, Løbersli I, Urdahl AM et al. Norwegian Sheep Are an Important Reservoir for Human-Pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(12):4083–91.

Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of bacterium *coli neapolitanum* from summer diarrhea of infants. *J Pathol Bacteriol* 1945.

Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM et al. Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* 2005;192(8):1422–9.

Brunder W, Schmidt H, Karch H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996;142(11):3305–15.

Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch, H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 1999;145(5):1005–14.

Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Le Hello S, King L-A, Van Cauteren D, Lefevre S et al. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Eurosurveillance* 2019;24(8):1–9.

Bugarel M, Beutin L, Fach P. Low-density macroarray targeting non-lócus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Appl Environ Microbiol* 2010a;76(1):203–11.

Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol* 2010b;142(3):318–29.

Bugarel M, Beutin L, Scheutz F, Loukiadis E, Fach P. Identification of Genetic Markers for Differentiation of Shiga Toxin-Producing, Enteropathogenic, and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26. *Appl Environ Microbiol* 2011a;77(7):2275–81.

Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: A basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol* 2011b;11(1):142.

Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil Vanessa. *MemInstOswaldo Cruz* 2007;102 :839–44.

Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *VetRes* 2005;36(3):289–311.

Caprioli A, Scavia G, Morabito S. Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2014;2(6):1–12.

Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Santos LF, Irino K, Vaz TMI, Bergamini AMM et al. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 2007;274(2):329–34.

Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat, MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. *J Pediatr* 2005;146(1):54–61.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M & Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(4): 822- 880.

Dean P, Maresca M, Kenny B. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* 2005;8(1):28–34.

Delannoy S, Beutin L, Fach. P. Use of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Sequence Polymorphisms for Specific Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains of Serotypes O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, and O157:H7 by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2012;50(12):4035–40.

Delannoy S, Beutin L, Fach P. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC strains based on detection of various combinations of Type III effector genes. *J Clin Microbiol* 2013a;51(10):3257–62.

Delannoy S, Beutin L, Fach P. Towards a Molecular Definition of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Detection of Genes Located on O Island 57 as Markers To Distinguish EHEC from Closely Related Enteropathogenic *E. coli* Strains. *J Clin Microbiol* 2013b;51(4):1083–8.

Delannoy S, Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Liguori S, Fach P. Characteristics of Emerging Human-Pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 Strains Isolated in France between 2010 and 2013 and Carrying the *stx 2d* Gene Only. Ledebor NA, organizador. *J Clin Microbiol* 2015;53(2):486–92.

Delannoy S, Chaves BD, Ison SA, Webb HE, Beutin L, Delaval J et al. Revisiting the STEC Testing Approach: Using *espK* and *espV* to Make Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Detection More Reliable in Beef. *Front Microbiol* 2016;7(1):1–10.

Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2004; 101:3597-3602.

Dias RCB, Santos BC, Santos LF, Vieira MA, Yamatogi RS, Mondelli AL et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2016;124(4):299–308.

Dobrindt U, Chowdary MG, Krumbholz G, Hacker J. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* 2010;199(3):145–54.

Donnenberg MS, Girón JA, NataroJP, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 1992;6(22):3427–37.

Dziva F, Mahajan A, Cameron P, Currie C, McKendrick IJ, Wallis TS et al. EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2007;271(2):258–64.

EFSA - European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J* 2015.

Elliott SJ, Wainwright LA, McDanie I TK, Jarvis KG, Deng Y, Lai L-C et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998;28(1):1–4.

Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takaeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem* 1988; 171:45–50.

Fagundes-Neto U, Freymüller E, Gandolfi Schimitz L, Scaletsky I. Nutritional impact and ultrastructural intestinal alterations in severe infections due to enteropathogenic *Escherichia coli* strains in infants. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 180-185.

Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2017; 390:681–96.

Feng PCH, Monday SR, Lacher DW, Allison L, Siitonen A, Keys C, et al. Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(11):1701–6.

Fierz L, Cermela N, Hauser E, Nüesch-Inderbinnen M, Stephan R. Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated during 2010–2014 from Human Infections in Switzerland. *Front Microbiol* 2017;8:1–7.

Food E, Authority S. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *Eur Food Saf Auth J* 2016;14(12):1–231.

Foster MA, Iqbal J, Zhang C, McHenry R, Cleveland BE, Romero-Herazo Y et al. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;83(3):319–24.

Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien, AD et al. Estrutura da toxina shiga tipo 2 (Stx2) de *Escherichia coli* O157: H7. *J. Biol. Chem* 2004; 279: 27511-27517.

Friedrich A W, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A et al. *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms . *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185(1): 74–84.

- Fruth A, Prager R, Tietze E, Rabsch W, Flieger A. Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: diversity, prevalence, and outbreaks. *Int J Med Microbiol* 2015;305:697–704.
- García-Gutiérrez E, Almendros C, Mojica FJM, Guzmán NM, García-Martínez J. CRISPR content correlates with the pathogenic potential of *Escherichia coli*. *PLoS One* 2015;10(7):134138.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect Immun* 2005;73(5):2573–85.
- Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Girão VBC, Guth BEC, Vaz TMI et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1851–5.
- Goosney DL, Gruenheid S, Finlay BB. Gut Feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16(1):173–89.
- Guth BE, Souza RL, Vaz TMI, Kinue I et al. First Shiga *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Emergence of Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus S sciuri*, Greece. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8 (5): 535–536.
- Hazen TH, Sahl JW, Fraser CM, Donnenberg MS, Scheutz F, Rasko DA. Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(31):12810–5.
- Henao OL, Jones TF, Vugia DJ, Griffin PM. Foodborne diseases active surveillance network—2 decades of achievements, 1996–2015. *Emerg Infect Dis* 2015;21(9):1529–36.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2009;297(2):137–49.
- Hinenoya A, Yasuda N, Mukaizawa N, Sheikh S, Niwa Y, Awasthi SP et al. Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen. *Int J Med Microbiol* 2017;307(8):564–71.
- Hughes AC, Zhang Y, Bai X, Xiong Y, Wang Y, Yang X et al. Structural and functional characterization of stx2k, a new subtype of Shiga toxin 2. *Microorganisms* 2020; 8 (1) 1-18.
- Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe CM, Lincicome LL, King AJ, Keusch GT et al. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1999;67(12):6670–7.
- Ibenyassine K, AitMhand R, Karamoko Y, Cohen N, Ennaji MM. Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water. *Lett Appl Microbiol* 2006;43(5):528–33.
- Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, et al. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res* 2015;22(1):101–7.



Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U et al. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 2003; 71:3634–3638.

Kanayama A, Yahata Y, Arima Y, Takahashi T, Saitoh T, Kanou K et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC Infect Dis* 2015;15(1):1-8.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(2):123–40.

Karmali MA, Petric M, Lim C, McKeough PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985;151(5):775–82.

Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebel IK, Johnson S, Reid-smith R et al. Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *J Clin Microbiol* 2003;41(11):4930–40.

Kelly M, Hart E, Mundy R, Marches O, Wiles S, Badea L, Luck S, Tauschek M, Frankel G, Robins-Browne RM, Hartland EL. Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun* 2006; 74:2328-2337.

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997; 91: 511-520

Knutton S, Phillips AD, Smith HR, Gross RJ, Shaw R, Watson P. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect. Immun*1989; 59(1):365-371.

Konczy P, Ziebell K, Mascarenhas M, Choi A, Michaud C, Kropinski AM, et al. Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2008;190 (17):5832–40.

Konowalchuck J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1977; 18 (3):775-779.

Krüger A, Lucchesi PMA, Parma AE. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: Type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(1):73–9.

Krüger A, Lucchesi PMA. Shiga toxins and stx phages: Highly diverse entities. *Microbiol* 2015 a;161(3):451–62.

Krüger A, Lucchesi PMA, Sanso AM, Etcheverría AI, Bustamante AV, Burgán J et al. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. *Front Cell Infect Microbiol* 2015b; 5:1–8.

Lacher DW, Gangiredla J, Patel I, Elkins CA, Feng PCH. Use of the Escherichia coli identification microarray for characterizing the health risks of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from foods. *J. Food Prot* 2016; 79: 1656–1662.

Lajhar SA, Brownlie J, Barlow R. Survival capabilities of Escherichia coli O26 isolated from cattle and clinical sources in Australia to disinfectants, acids and antimicrobials. *BMC Microbiology* 2017; 17(1): 1–10.

López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic Escherichia coli. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):127–31.

Lorenz SC, Son I, Maounounen-Laasri A, Lin A, Fischer M, Kase JA. Prevalence of hemolysin genes and comparison of ehxA subtype patterns in Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and Non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(20):6301–11.

Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N et al. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli infection: USA. *Epidemiol Infect* 2014;142(11):2270–80.

Mainil J. Escherichia coli virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;152(1):2–12.

McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92(5):1664–8.

Mellmann A, Bielaszewska M, Karch H. Intrahost Genome Alterations in Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Gastroenterology* 2009;136(6):1925–38

Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2014;2(2):1–21.

Miko A, Lindstedt BA, Branda LT, Løbersli I, Beutin L. Evaluation of multiple locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent Escherichia coli O26 strains. *FEMS Microbiol Lett* 2010;303(2):137–46.

Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59(3):451–80.

Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun* 1983; 41(3):1340-1351.

Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Pestana De Castro AF. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic escherichia coli types. *Zoonoses Public Health* 2009;56(5):229–37

Moura RA, Sircili MP, Leomi IL, Matté MH, Trabulsi LR, Elias WP et al. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(23):7399–408.

Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschape H et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3380–90.

Nadler C, Baruch K, Kobi S, Mills E, Haviv G, Farago M et al. The type III secretion effector NleE inhibits NF- $\kappa$ B activation. *PLoS Pathog* 2010;6(1):1–11.

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Krishnan T, Ganguly S, Saha DR et al. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. *Gut Pathog* 2010;2(1):1–13.

Nataro JP & Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(1):142–201.

Neter E, Webb CR, Shumway CN, Murdock MR. Study on Etiology, Epidemiology, and Antibiotic Therapy of Infantile Diarrhea, with Particular Reference to Certain Serotypes of *Escherichia coli*. *American J. Public Health* 1951; 41: 1490-1496.

Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2000;35(2):275–88.

Nishio M, Okada N, Miki T, Haneda T, Danbara H. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Microbiology* 2005;151(3):863–73.

Nguyen TV, Van P Le, Huy C Le, Gia KN, Weintraub A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2005;43(2):755–60.

Nguyen RN, Taylor LS. Atypical Enteropathogenic 2006;12(4):597–603.

O'Brien A, Lively T, Chen M, Rothman S, Forma I S. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1983;702.

Ochoa TJ and CCA. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(5):478–483.

Ori EL, Takagi EH, Andrade TS, Miguel BT, Cergole-Novella MC, Guth BEC et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect* 2019;147

Oswald E , Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marche`s O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity* 2000; 68:(1): 64–71.

Park JH, Oh SS, Oh KH, Shin J, Jang EJ, Jun BY et al. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. *Foodborne Pathog Dis* 2014;11(10):775–81.

Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Curr Opin Gastroenterol* 1998;11(3):450–79.

Peresi JTM, Almeida IAZC, Vaz TMI, Hernandez RT, Carvalho IST, Silva SIL et al. Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. *Food Control* 2016; 63:165–70.

Persson S, Olsen KEP, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 2007;45(6):2020–4.

Piazza R M, Delannoy S, Fach P, Saridakis HO, Pedroso MZ, Rocha LB et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26: H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 2013; 79: (22) 6847–6854.

Pollock KG, Bhojani S, Beattie TJ, Allison L, Hanson M, Locking ME. Highly Virulent *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2011;17(9):1777–9.

Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD et al. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008;14(5):763–71.

Riley M. Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1993;57(4):862–952.

Robins-Browne RM & Hartland EL. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(4):467–75.

Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and Ricin are All Single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1989;264(1):596–601.

Shetty V, Shetty A, Karunasagar I, Kumar S, Karunasagar I. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *J Lab Physicians* 2012;4(1):24–9.

Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 2012;50(9):2951–63.

Schmidt H, Beutin L. and Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*.1995;63 (3): 1055-1061.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. SãoPaulo: Varela; 2010.

Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(3):181–6.

Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Seminar Shiga-toxin producing. *Epidemiology* 2005a; 365: 1073–1086.

Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H et al. *tox*B Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infect Immun* 2001;69(11):6660–9.

Taylor DE, Rooker M, Keelan M, Ng LK, Martin I, Perna NT et al. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol* 2002;184(17):4690–8.

Tesh VL. Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* 2010;5(3):431–53.

Toma C, Espinosa EM, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, et al. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):4937–46.

Toro M, Cao G, Ju W, Allard M, Barrangou R, Zhao S et al. Association of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) elements with specific serotypes and virulence potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(4):1411–20.

Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002;8(5):508–13.

Uhlich G.A. KatP contributes to OxyR-regulated hydrogen peroxide resistance in *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology* 2009;155(11):3589–98.

Vaz TMI, Kato MAMF, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM. et al. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(2):903–905.

Verhaegen B, Van Damme I, Heyndrickx M, Botteldoorn N, Elhadidy M, Verstraete K, Dierick K et al. Evaluation of detection methods for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food. *Intl J Food Microbiol* 2016; 219:64–70.

Vidal JE, Canizález RA, Gutiérrez J, Navarro F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* 2007;49(5):376-86.

Vieira M.A.M. Ilhas de patogenicidade Pathogenicity islands Islas de patogenicidad. *O mundo da saúde* 2009;33(4):406–14.

Vieira MA, dos Santos LF, Dias RCB, Camargo CH, Pinheiro SRS, Gomes TAT, et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol* 2016;65(9):998–1006.

Zhang WL, Bielaszewska M, Bockemuhl J, Schmidt H, Scheutz F, Karch H. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. *J Clin Microbiol* 2000b;38(8):2989–93.

Zhang W, Mellmann A, Sonntag AK, Wieler L, Bielaszewska M, Tschäpe H et al. Structural and functional differences between disease-associated genes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111. *Int J Med Microbiol* 2007;297(1):17–26.

Zweifel C, Cernela N, Stephan R. Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26: H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(17):5411–3.

Wickham ME, Lupp C, Mascarenhas M, Vázquez A, Coombes BK, Brown NF et al. Bacterial Genetic Determinants of Non-O157 STEC Outbreaks and Hemolytic-Uremic Syndrome after Infection. *J Infect Dis* 2006;194(6):819–27.

Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman, E., Procop G., Schrecherberger P., et al. *As Enterobacteriaceae*. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 208-299.

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler L.H et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol. Microbiol* 2006, 60, 1136–1151.

Wong ARC, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 2011;80(6):1420–38.

Yamamoto T. & Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* 1996; 64, 1441–1445.

**ANEXO I.** Origem e características de 48 cepas de STEC e aEPEC O26:H11 envolvidas no presente estudo.

<b>Cepa</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Procedência</b>	<b>Origem/ Condição clínica<sup>1</sup></b>	<b>Perfil de marcadores genotípicos de triagem</b>	<b>Patotipo</b>	<b>Sorotipo</b>
IAL6170	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6169	2006	São Paulo	Alimento	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6168	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6167	2000	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6166	2001	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6165	Não consta	Minas Gerais	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6164	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6163	Não consta	São Paulo	Humano/DS	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6162	2008	Minas Gerais	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6161	2017	São Paulo	Humano/DA	<i>stx, eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	STEC	O26:H11
IAL6160	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6159	2004	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6158	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6157	2006	Espírito Santo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6156	2002	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6155	2005	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6154	2005	Rio de Janeiro	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6153	2005	Rio de Janeiro	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6152	2002	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6151	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6150	2004	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6149	2004	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAL6148	2011	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAI 6147	2003	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAI 6146	2003	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAI 6145	2003	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAI 6144	2003	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11
IAI 6143	2005	Rio de Janeiro	Humano/DA	<i>eae, wzx<sub>O26</sub>, fliC<sub>H11</sub></i>	aEPEC	O26:H11

IAL 6142	2003	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6141	Não consta	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6140	2012	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6139	2012	Minas Gerais	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6138	2013	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6137	2015	Minas Gerais	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6136	2015	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6135	2015	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6134	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6133	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6132	2007	Minas Gerais	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6131	2007	São Paulo	Animal/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6130	2007	São Paulo	Animal/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6129	2007	São Paulo	Animal/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6128	2007	São Paulo	Animal/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6127	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6126	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6125	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6124	2007	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11
IAL6123	2008	São Paulo	Humano/DA	<i>eae, wzx</i> <sub>O26</sub> , <i>fliC</i> <sub>H11</sub>	aEPEC	O26:H11

<sup>1</sup>DA, diarreia aguda; DS, diarreia sanguinolenta.



## **ANEXO II. Soluções e meios de cultura empregados no presente estudo.**

### **MEIOS DE CULTURA**

A procedência dos meios de cultura utilizados foi Sigma (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA). Os meios na forma desidratada foram preparados seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente foram esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

#### **Meios utilizados para manutenção das cepas bacterianas**

##### **Meio estoque ambiente**

Peptona	5 g
NACL	5 g
Extrato de carne	1 g
Ágar	7,5 g
Água destilada	1000 mL
pH = 7,4 aproximadamente 7,6	

##### **Meio estoque congelamento**

TSB	1 mL
Glicerol 15%	150 mL

## **Meios utilizados para cultivo bacteriano e para ensaio de verotoxicidade**

### **Caldo Triptona de Soja (TSB)**

O meio foi hidratado e distribuído em tubos de ensaio, no volume de 5 mL por tubo, esterilizado e mantido a 4°C até momento de uso.

### **Ágar Triptona de Soja (TSA)**

O meio foi hidratado, esterilizado e distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e mantido a 4°C até o momento de uso.

### **Caldo Penassay**

O meio foi preparado seguindo as especificações do fabricante, autoclavado e distribuídos 10 mL do caldo em tubos de 12 X 120 mm, sendo mantidos a 4°C até o momento de uso.

### **Ágar chocolate**

O meio foi preparado seguindo as especificações do fabricante, autoclavado e distribuídos 10 mL do caldo em tubos de 12 X 120 mm, sendo mantidos a 4°C até o momento de uso.

## **Ágar MacConkey**

O meio foi preparado seguindo as especificações do fabricante, autoclavado e distribuído um volume de 20 mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo mantido a 4°C até o momento de uso.

## **Ágar sangue**

O meio foi preparado seguindo as especificações do fabricante, autoclavado e distribuído um volume de 20 mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo mantido a 4°C até o momento de uso.

## **SOLUÇÕES**

A procedência dos sais e reagentes foi Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Lituânia, Europa) e Oxoid (Oxoid, Inglaterra, Europa).

## **Soluções utilizadas nos ensaios de PCR convencional e pesquisa da produção da enterohemolisina**

### **Corante de arraste (solução estoque)**

Azul de Bromofenol	0,07%
SDS	2,0%
Glicerol	30%

O corante foi distribuído em tubos e mantido a - 20° C.

### **Corante de arraste (solução de uso)**

Solução estoque	1,8 mL
TAE 50X	0,36 mL

A solução foi distribuída em tubos do tipo eppendorf e mantidas a 4°C.

### **Solução de Cloreto de Cálcio 1M**

Cloreto de cálcio	11,1 g
Água destilada	100 mL

Pesar o cloreto de cálcio e dissolver água destilada, autoclavar a 121-124°C por 15 minutos e armazenar em temperatura ambiente.

### **Solução de EDTA (0,5M pH 8,0)**

Tris Base	111,6 g
NaOH	≅ 6 g

A solução de EDTA foi preparada e guardada em temperatura ambiente.

### **Solução tampão TAE (50X)**

Tris Base (0,04M)	242g
EDTA (0,5M pH 8,0)	100 mL
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

A solução foi preparada, esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos, e estocada em temperatura de geladeira.

### **Solução tampão TRIS-acetato EDTA (TAE) pH 8,0 – 10x**

Tris base	242 g
Ácido acético	57 mL
NA <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	100 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

### **Soluções utilizadas no sequenciamento**

#### **Solução de polietilenoglicol (PEG) a 20% PM 8000 em solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 2,5M**

Polietilenoglicol PM 8000	20 g
NaCl	14,6 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Agitar com aquecimento por aproximadamente 30 a 60 minutos para dissolução do PEG (Sigma P5413). A solução ficará viscosa. Armazená-la à temperatura ambiente.

#### **Acetato de Sódio (NaOAc3H<sub>2</sub>O) PM 136,08**

NaOAc3H <sub>2</sub> O PM: 136,08	4,08 g
Água destilada	10 mL

### **Etanol Acetato de Sódio (NaOAc/ETOH) PM 136,08**

NaOAc 3M	280 µL
ETOH 100%	7 mL
Água destilada	2,1 mL

### **Soluções utilizadas nos ensaios de PFGE**

#### **Solução Tris – HCL 1M pH 8,0**

Tris- HCL	157,6 g
Água MilliQ	1000 mL

O Tris – HCL foi diluído em 800 mL de água MilliQ, e o pH foi ajustado com mais ou menos 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10N, o volume foi completado para 1000 mL com Água MilliQ, e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

#### **Solução EDTA 0,5 pH 8,0**

Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	186,12 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O EDTA foi dissolvido em 800 mL de água MilliQ, o pH da solução foi ajustado para 8,0 com NaOH (aproximadamente 50 ml de NaOH 10N) e o volume foi completado para 1000mL. A solução pronta foi esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente até o momento de uso.

### **Solução – tampão Tris - EDTA (TE) pH 8,0**

Tris 1M pH 8,0 (item 3.3.6.1)	10 mL
EDTA 0,5 pH 8,0 (item 3.3.6.2)	2 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

Esta solução foi preparada no momento de uso.

### **Solução de N-Lauryl-Sarcosine a 10% (Sarcosyl)**

Sarcosyl	10 g
Água MilliQ	90 mL

A solução de Sarcosyl foi cuidadosamente adicionada à água e dissolvida suavemente por aquecimento a 50-60°C. A solução foi mantida a temperatura ambiente até o momento de uso.

### **Solução de Proteinase K 20 mg/mL**

Proteinase K em pó	100 mg
Água MilliQ	5 mL

A solução de proteinase foi dissolvida em água MilliQ e distribuída em tubos do tipo eppendorf. A solução foi mantida a - 20°C até o momento de uso.

### **Solução de suspensão celular (SSC)**

Tris 1M pH 8,0 (item 3.3.6.1)	10 mL
EDTA 0,5 pH 8,0 (item 3.3.6.2)	2 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

A solução foi preparada no momento de uso.

### **Solução de lise celular (SLC)**

(Tris 50mM: EDTA 50 mM, pH 8,0 + 1% de sarcosyl + 0,1 mg/mL de proteinase K)

Tris 1M pH 8,0 (item 3.3.6.1)	2,5 mL
EDTA 0,5 pH 8,0 (item 3.3.6.2)	5 mL
Sarcosyl 10% (item 3.3.6.4)	5 mL
Proteinase K 20 mg/mL (item 3.3.6.5)	0,25 mL
Água MilliQ q.s.p	50 mL

A solução foi preparada somente no momento de uso.

### **Solução-tampão Tris EDTA-Borato (TBE) pH 8,0 (10X):**

(Tris – base 890 mM: EDTA 25mM:H3BO3 890mM)

Tris base	108 g
Ac. Bórico (H3BO3)	55 mL
EDTA (Na2EDTA)	9,3 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

A solução foi esterilizada por autoclavação após o uso e mantida a temperatura ambiente até o momento do uso.



**Solução de brometo de etídio:**

O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada a 5 mg/mL e armazenado como solução-mãe em frasco âmbar em temperatura de 4°C. A solução de uso foi preparada diluindo-se quatro gotas em 1000 mL de água destilada.