

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Gillian Ferreira dos Santos Rocha

**VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE
TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE BOVINOS E ALIMENTOS NO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO ENTRE 1989 E 2014**

Rio de Janeiro

2021

Gillian Ferreira dos Santos Rocha

VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE
TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE BOVINOS E ALIMENTOS NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO ENTRE 1989 E 2014

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso;

Co-orientador: Carlos Adam Conte Junior

Rio de Janeiro
2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Rocha, Gillian Ferreira dos

Virulência e diversidade genética de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) isolada de bovinos e alimentos no estado do Rio de Janeiro entre 1989 e 2014. / Gillian Ferreira dos Rocha. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

58 f. : fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso. Co-orientador: Carlos Adam Conte Junior.

1. *Escherichia coli* Shiga Toxigênica. 2. Virulência. 3. Epidemiologia. 4. Zoonoses Virais. I. Título.

Virulence and genetic diversity of shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from cattle and food in the state of Rio de Janeiro between 1989 and 2014.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Gillian Ferreira dos Santos Rocha

VIRULÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE BOVINOS E ALIMENTOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO ENTRE 1989 E 2014

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Instituto Nacional de Controle de Qualidade

Prof.^a Dr.^a. Alice Gonçalves Martins Gonzalez
Universidade Federal Fluminense

Dr. Pedro Henrique Nunes Panzenhagen
Universidade Federal do Rio de Janeiro

ORIENTADORES

Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

RESUMO

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é um importante patógeno veiculado por alimentos, frequentemente associado ao consumo de produtos cárneos de origem bovina, sendo estes animais o principal reservatório. Em humanos a infecção por STEC pode causar quadros desde diarreia leve a sanguinolenta, colite hemorrágica (CH), com o risco de progressão para a síndrome hemolítico urêmica (SHU). A emergência de novas estirpes patogênicas aumenta a importância da vigilância e caracterização das cepas STEC circulantes. O presente estudo teve como objetivo a avaliação da virulência e diversidade genética de cepas STEC provenientes de alimentos e bovinos isoladas em períodos distintos no Estado do Rio de Janeiro. Setenta e cinco cepas STEC foram estudadas, incluindo 38 cepas isoladas de alimentos e bovinos entre 1989 e 1995 (período 1 - P1), 37 cepas isoladas de bovinos entre 2012 e 2014 (período 2 - P2). A sorotipagem revelou a presença de diversos sorotipos, no entanto, cepas dos sorotipos O113:H21, R:H19, O22:H16 e O82:H8, descritos em associação com doença humana, estiveram presentes nos dois grupos. Foi observada uma grande diversidade de perfis de virulência nos dois períodos estudados. No tocante aos genes que codificam a toxina Shiga, a presença isolada do *stx2* foi predominante em ambos os grupos, ocorrendo em 81,6% das STEC P1 e 72,9% das STEC P2. Os genes *eae*, *iha*, *astA*, *ehxA*, *saa*, *subA*, *pilS* e *toxB* foram investigados por PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo os mais prevalentes em ambos os grupos os genes *ehxA* (73% em P1 e 59,4% em P2), *iha* (68,4% em P1 e 64,9% em P2) e *saa* (68,4% em P1 e 48,6% em P2). O teste de adesão em microplacas de poliestireno revelou que 50% das cepas P1 e 43,2% das cepas P2 produziram biofilme. A expressão de fímbrias curli foi observada em 18,4% das cepas P1 e 59,4% das cepas P2. Em ambos os grupos, a produção de enterohemolisina em ágar sangue esteve relacionada com o genótipo *ehxA* positivo. O filogrupo B1 foi o mais frequente (76% - P1 e 65% - P2), seguido do filogrupo A (11% em ambos os grupos). O ensaio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), realizado nos sorotipos comuns aos dois grupos (n=14), gerou nove perfis distintos. As cepas STEC O113:H21 P1 (GC138, GC20) e P2 (M2 e CM19) demonstraram índice de similaridade (IS) de 86%. As cepas B16/2 e CM11, de sorotipo O82:H8, isoladas em períodos distintos, apresentaram IS de 87%. Os dados sugerem que cepas STEC isoladas de bovinos, e apresentando perfil associado à doença humana, podem se manter estáveis geneticamente por um longo período no reservatório animal, representando um problema de saúde pública devido ao seu potencial de virulência.

Palavras-chave: STEC. Virulência. Epidemiologia. Zoonose.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) is an important foodborne pathogen, generally associated with the consumption of undercooked meat products of bovine origin. STEC infection can occur by ingestion of water or vegetables contaminated by cattle feces. In humans, STEC can cause illness ranging from mild to bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome (HUS). The emergence of new pathogenic strains increases the importance of surveillance and characterization of circulating STEC strains. The objective of this study was to compare and evaluate the virulence and genetic relatedness of STEC strains isolated from cattle and food in different periods in Rio de Janeiro State. Seventy-five strains were studied, including 38 strains isolated from food and cattle between 1989 and 1995 (P1), as well as 37 strains isolated from cattle between 2012 and 2014 (P2). Serotyping revealed a diverse distribution of STEC serotypes, however, O113:H21, R:H19, O22:H16, and O82:H8 strains, described in association with human disease, were present in both groups. Regarding the genes encoding the Shiga toxin, the isolated presence of *stx2* was predominant in both groups, occurring in 81.6% of STEC P1 and 72.9% of STEC P2. The *eae*, *iha*, *astA*, *ehxA*, *saa*, *subAB*, *pilS*, and *toxB* genes were investigated by PCR ("Polymerase Chain Reaction"). The most prevalent genes in both groups were *ehxA* (73,7% in P1 and 59,4% in P2), *iha* (68,4% in P1 and 64,9% in P2), and *saa* (68,4% in P1 and 48,6% in P2). A great diversity of virulence profiles was observed in the two studied periods. The adhesion test on polystyrene microplates revealed that 50% of P1 and 43.2% of the P2 strains produced biofilm. Expression of curli fimbriae was found in 18.4% of P1 and 59.4% of the P2 strains. In both groups, the production of enterohemolysin in blood agar agreed with the positive *ehxA* genotype. Phylogroup B1 was the most frequent (76% - P1 and 65% - P2), followed by phylogroup A (11% in both groups). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assay, performed in serotypes common to both groups (n=14), generated nine distinct PFGE profiles. P1 (GC138, GC20) and P2 (M2 and CM19) STEC strains, serotype O113:H21, showed a similarity index (IS) of 86%. Strains B16/2 and CM11, serotype O82:H8, isolated in different periods, presented IS of 87%. The data suggest that STEC strains isolated from cattle and showing a profile associated with human disease may be genetically stable for a long time in the animal reservoir, representing a public health problem, due to their virulence potential.

Keywords: STEC. Virulence. Epidemiology. Zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Iniciadores dos genes de virulência utilizados nos ensaios de PCR.	28
Tabela 1 - Sorotipos, filogrupos e marcadores de virulência de cepas STEC isoladas entre 1989 e 1995 (P1)	343
Tabela 2 - Sorotipos, filogrupos e marcadores de virulência de cepas STEC isoladas entre 2012 e 2014 (P2).....	354
Tabela 3 - Perfis de virulência de cepas STEC isoladas nos períodos entre 1989 a 1995 (P1) e 2012 a 2014 (P2).....	37
Figura 1 - Comparação da ocorrência dos marcadores de virulência entre cepas STEC dos grupos do P1 e P2 por PCR.....	36
Figura 2 - Comparação do fenótipo hemolítico em ágar sangue entre os grupos P1 e P2.....	40
Figura 3 - Comparação da produção de biofilme em placas de poliestireno entre cepas STEC isoladas em períodos distintos, P1 e P2	41
Figura 4 - Dendrograma PFGE baseado na análise de macrorestrição do DNA genômico com <i>Xba</i> I, mostrando as relações entre as cepas STEC agrupadas por sorotipos semelhantes dos grupos P1 e P2	43

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adesão e apagamento (<i>Attaching and effacing</i>)
AAF	Fímbrias de aderência agregativa (<i>Aggregative adherence fimbriae</i>)
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica (<i>Atypical enteropathogenic Escherichia coli</i>)
AIEC	<i>Escherichia coli</i> invasiva aderente (<i>Adherent-invasive Escherichia coli</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BFP	Pilus tipo IV (<i>Bundle-forming pilus</i>)
Cah	Autotransportador ligante de cálcio homólogo ao antígeno 43
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
Cdt	Toxina citoletal distensora (<i>Cytolethal distending toxin</i>)
CFA	Fator de colonização (<i>Colonization factor antigen</i>)
CF	Fator de colonização (<i>Colonization factor</i>)
CH	Colite hemorrágica
CS	Antígenos de superfície de coli (<i>Coli surface antigen</i>)
DA	Aderência difusa (<i>Diffuse adherence</i>)
DAEC	<i>Escherichia coli</i> aderente difusa (<i>Diffusely adherent Escherichia coli</i>)
DAF	Fator de aceleração do decaimento (<i>Decay-accelerating factor</i>)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (<i>Enteroaggregative Escherichia coli</i>)
EAF	Fator de aderência de EPEC (<i>EPEC adherence fator</i>)
EAST1	Enterotoxina termoestável enteroagregativa (<i>Escherichia coli heat-stable enterotoxin I</i>)
Efa-1/LifA	Fator para aderência de <i>Escherichia coli</i> /linfostatina (<i>EHEC factor for adherence/lymphostatin</i>)
EGMs	Elementos genéticos móveis
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicas (<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>)
Ehly	Enterohemolisina (<i>Enterohemolysin</i>)
IEIC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>)
Elf	<i>Escherichia coli</i> YcbQ laminin-binding fimbria
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>)
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal (<i>Extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i>)

FimH	Pili do tipo I
Gb3	Globotriaosilceramida
Hcp	Coli pilus hemorrágico (<i>Hemorrhagic coli pilus</i>)
Iha	Adesina homóloga à IrgA de <i>Vibrio Cholerae</i>
InPEC	<i>Escherichia coli</i> intestinal (<i>Intestinal Escherichia coli</i>)
LAA	<i>Locus of Adhesion and Autoaggregation</i>
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LPA	<i>Locus of Proteolysis Activity</i>
LPF	Fímbria polar longa (<i>Long polar fimbriae</i>)
LT	Toxina termolábil
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NMEC	Meningite neonatal por <i>Escherichia coli</i> (<i>Neonatal meningitis by Escherichia coli</i>)
PAI	Ilha de patogenicidade (<i>Pathogenicity island</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Eletroforese de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
PilS	Pilus tipo IV
Sab	Proteína autotransportadora (<i>Autotransporter protein</i>)
SHI	Ilha de patogenicidade de <i>Shigella</i> (<i>Shigella pathogenicity island</i>)
SRL	Locus de resistência de <i>Shigella</i> (<i>Shigella resistance locus</i>)
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (<i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>)
Stx1	Toxina Shiga 1
Stx2	Toxina Shiga 2
T3SS	Sistema de secreção do tipo III (<i>Type III secretion system</i>)
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica (<i>Typical enteropathogenic Escherichia coli</i>)
TGI	Trato gastrointestinal
ToxB	Adesina homóloga à Efa-1/LifA
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica (<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>)
WGS	Sequenciamento completo do genoma (<i>Whole genome sequencing</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	100
1.1 Características gerais de <i>Escherichia coli</i>	100
1.2 Patotipos intestinais de <i>E. coli</i>	11
1.2.1 <i>E. coli</i> enteropatogênica - EPEC.....	11
1.2.2 <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga - STEC	12
1.2.3 <i>E. coli</i> enteroagregativa - EAEC.....	13
1.2.4 <i>E. coli</i> enterotoxigênica - ETEC	14
1.2.5 <i>E. coli</i> enteroinvasiva - EIEC	14
1.2.6 <i>E. coli</i> aderência difusa - DAEC.....	15
1.2.7 <i>E. coli</i> invasiva aderente - AIEC.....	15
1.3 Fatores de virulência de STEC	16
1.3.1 Toxina Shiga	16
1.3.2 Outras toxinas de STEC	17
1.3.3 <i>Locus of enterocyte effacement</i> - locus LEE.....	17
1.3.4 Enterohemolisina	18
1.3.5 Fímbrias e outras adesinas.....	18
1.4 Sorotipos de STEC	19
1.5 Agrupamento filogenético de <i>E. coli</i>.....	19
1.6 Relevância da tipificação molecular de STEC através de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	20
1.7 Aspectos da legislação sanitária brasileira relacionados à <i>E. coli</i> e STEC	21
1.8 Epidemiologia de STEC	21
1.9 Justificativa	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral:.....	24
2.2 Objetivos específicos:	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Origem e isolamento das cepas STEC	25
3.2 Investigação de marcadores de virulência de STEC.....	26
3.3 Produção de enterohemolisina.....	26
3.4 Avaliação da formação de biofilme	26
3.4.1 Teste em Ágar Vermelho Congo (CRA) para detecção de fímbria curli de <i>E. coli</i>	26

3.4.2 Teste de adesão em microplacas de poliestireno	27
3.5 Filotipagem.....	29
3.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	29
3.6.1 Montagem dos <i>plugs</i> de agarose	29
3.6.2 Processo de lise celular nos <i>plugs</i>	30
3.6.3 Digestão enzimática do DNA nos <i>plugs</i>	30
3.6.4 Montagem do gel e condições de corrida eletroforética.....	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Sorotipos e tipos toxigênicos das cepas STEC dos grupos P1 e P2.....	32
4.2 Marcadores de virulência das cepas STEC dos grupos P1 e P2	35
4.3 Produção de enterohemolisina.....	38
4.4 Avaliação da produção de biofilme	38
4.4.1 Teste em Ágar Vermelho Congo	38
4.4.2 Teste de adesão em microplacas de poliestireno	38
4.5 Filotipagem.....	39
4.6 Avaliação da similaridade genética por PFGE	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de *Escherichia coli*

Em 1885, Theodor Escherich relatou o isolamento e caracterização morfológica de hastas curtas e delgadas em fezes de crianças, as quais posteriormente nomeou de “*Bacterium coli commune*” (ESCHERICH, 1988). Após a primeira descrição científica deste micro-organismo outras nomenclaturas foram utilizadas. O nome com o qual estamos familiarizados hoje em dia, *Escherichia coli*, foi proposto no início do século XX por Castellani e Chalmers (1919), porém esta designação foi reconhecida oficialmente pela comunidade científica apenas em 1954 (COWAN, 1954).

E. coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, inserida na classe Gammaproteobacteria. *E. coli* é um bacilo Gram negativo, não formador de esporos, que pode ser imóvel ou móvel, neste caso através de flagelos peritríquios. São bactérias mesófilas com temperatura ótima de crescimento próxima aos 37 °C e são capazes de crescer em ambiente aeróbico ou anaeróbico, sendo classificadas como anaeróbios facultativos. Fermentam a glicose, a lactose e outros açúcares, com possível formação de gás; são catalase e oxidase negativos; positivas para a prova do vermelho de metila (VM) e produtoras de indol; negativas para a prova de Voges-Proskauer (VP); não utilizam o citrato, não produzem H₂S (sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico) e não hidrolisam a ureia. A investigação deste perfil bioquímico pode ser utilizada para sua identificação (WINN et al., 2008).

Como a maioria das enterobactérias, *E. coli* é encontrada no trato gastrointestinal (TGI) de mamíferos como parte da microbiota residente, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro. Também podem ser encontrados em solo e especialmente em água, onde é considerada um indicador de contaminação fecal (JANG et al., 2017). Embora a maioria da espécie seja de organismos comensais inofensivos residentes da microbiota do TGI de animais e humanos, algumas cepas, ao adquirir genes de virulência através de diversos mecanismos de transferência genética (bacteriófagos, plasmídeos, transposons), tornam-se potencialmente patogênicas. No entanto, em indivíduos imunossuprimidos ou quando há o rompimento da barreira gastrointestinal, até cepas *E. coli* não patogênicas podem causar infecção (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A mobilidade dos genes de virulência entre cepas *E. coli* permitiu o surgimento de combinações persistentes em certos grupos, o que atribuiu a estes a capacidade patogênica de causar tanto doenças intestinais, quanto extraintestinais (CROXEN et al., 2013; KAPER;

NATARO; MOBLEY, 2004). As variantes patogênicas de *E. coli*, denominadas patotipos, são responsáveis por causar surtos e casos esporádicos no mundo. Os patotipos de *E. coli* associados a doenças intestinais são conhecidos como *E. coli* patogênicas intestinais (InPEC) ou *E. coli* diarreio gênicas. Já as *E. coli* responsáveis por causar doença em sítios não intestinais são conhecidas como *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC).

Patógenos de origem alimentar utilizam uma variedade de estratégias de sobrevivência para persistir e resistir ao estresse ambiental. Uma delas é a capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular de natureza exopolissacarídica aderida a uma superfície (DONLAN; COSTERTON, 2002). A formação de biofilme pode aumentar a resistência a antimicrobianos quando comparadas a bactérias planctônicas, assim como pode dificultar a ação de agentes esterilizantes no controle e erradicação dos microrganismos (JOSEPH et al., 2001). Já foi demonstrado que os biofilmes, em instalações de produção de alimentos, agem como uma fonte disseminadora, onde as bactérias podem se desprender da matriz extracelular e contaminar produtos alimentícios causando deterioração de alimentos, infecção e até casos graves de doença em humanos (KAPLAN, 2010).

1.2 Patotipos intestinais de *E. coli*

São conhecidos ao menos sete patotipos de InPEC: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* aderente difusa (DAEC) e *E. coli* invasiva aderente (AIEC), associada à doença de Crohn (CROXEN et al., 2013).

1.2.1 *E. coli* enteropatogênica - EPEC

EPEC foi o primeiro patotipo intestinal a ser identificado. Em 1945, após grandes surtos de diarreia infantil no Reino Unido, o pediatra John Bray (1945) observou a existência de um grupo de cepas *E. coli*, sorologicamente distintas, isoladas de crianças com diarreia, porém ausentes em crianças saudáveis. O termo “EPEC” foi usado pela primeira vez, em 1955, para descrever cepas epidemiologicamente relacionadas a uma série de surtos de diarreia infantil nas décadas de 1940 e 1950 (BRAY, 1945; ROBINS-BROWNE, 1987). Embora EPEC tenha sido responsável por grandes surtos em países desenvolvidos no passado, atualmente sua incidência está mais associada a questões geográficas e socioeconômicas

(KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Originalmente definidas por sorotipagem, as cepas de EPEC atualmente são classificadas com base em suas características patogênicas. A principal característica das EPEC é causar uma lesão denominada *attaching and effacing* (A/E; lesão de adesão e apagamento), caracterizada pela adesão íntima da célula bacteriana ao enterócito, com destruição das microvilosidades, modulação do citoesqueleto e formação de estruturas semelhantes a pedestais na célula eucariótica. Os genes responsáveis pela lesão A/E estão inseridos na ilha de patogenicidade LEE (*locus of Enterocyte Effacement*). Além da região LEE, as chamadas cepas EPEC típicas (tEPEC) possuem o plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), responsável por codificar um pilus tipo IV, chamado de *bundle-forming pilus* (BFP), responsável por intermediar a aderência entre as bactérias, como também possibilitar a aderência ao epitélio intestinal. Cepas EPEC que não possuem o plasmídeo EAF são classificadas como EPEC atípicas (aEPEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.2.2 *E. coli* produtora de toxina Shiga - STEC

STEC é um importante patógeno de origem alimentar com distribuição mundial. O primeiro relato de STEC foi feito no final da década de 1970 (KONOWALCHUCK et al., 1977) e sua atuação como patógeno humano foi descrita por Riley e colaboradores (1982). O principal fator de virulência de STEC é a toxina Shiga (Stx1 e/ou Stx2 e suas variantes), codificada por fagos temperados integrados ao cromossomo bacteriano. Esta toxina atua inibindo a síntese proteica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Além da produção de Stx, algumas STEC podem produzir a lesão A/E, característica atribuída às *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), um subgrupo de STEC que carregam a ilha de patogenicidade LEE (CROXEN et al., 2013). Geralmente, a infecção por STEC pode variar desde quadros de diarreia leve à sanguinolenta, colite hemorrágica (CH) com risco de progressão para síndrome hemolítico-urêmica (SHU), uma condição clínica agressiva que pode progredir para insuficiência renal e levar o indivíduo a óbito (NATARO; KAPER, 1998). A infecção por STEC ocorre através da via fecal-oral e está associada ao consumo de alimentos cárneos malpassados, produtos lácteos, vegetais e água contaminados com fezes de bovinos, pelo contato direto ou indireto com animais carreadores de STEC, como também pelo contato interpessoal (CAPRIOLI et al., 2014). Os ruminantes, em especial os bovinos, são considerados o principal reservatório de STEC, ou seja, mantêm e transmitem o patógeno, e sua presença em animais e no meio ambiente pode gerar sérios riscos à saúde humana, especialmente em países onde o consumo de carne bovina malpassada é um hábito comum

(KARMALI, 2018). Alguns bovinos são responsáveis por liberar grandes quantidades de STEC em suas fezes ($>10^4$ UFC/g), sendo assim, classificados como animais *super-shedders* (STEPHENS; MCALLISTER; STANFORD, 2009). A provável causa deste fenômeno está relacionada à formação de biofilme na junção reto-anal destes animais, onde posteriormente pode haver liberação de STEC por desprendimento bacteriano (MUNNS et al., 2015).

1.2.3 *E. coli* enteroagregativa - EAEC

E. coli enteroagregativa (EAEC) foi identificada pela primeira vez em 1987 em um estudo caso-controle onde mais de 500 cepas de *E. coli* tiveram seus padrões de adesão comparados (NATARO et al., 1987). Desde a sua caracterização inicial, EAEC foi relatada em doenças diarreicas endêmicas e epidêmicas em todo o mundo. Em geral, a infecção por EAEC é caracterizada por diarreia aquosa, geralmente com presença de muco, pode ser acompanhada por febre, náusea, vômito, dor abdominal e ocasionalmente com presença de sangue nas fezes (COHEN et al., 2005). Este patógeno tem como principal característica a adesão às células HEp-2 em um padrão conhecido como auto agregativo, onde as células bacterianas aderem umas às outras em uma configuração de “tijolo empilhado” (NATARO; KAPER, 1998). O padrão de agregação de EAEC é mediado por fimbrias de aderência agregativa (AAF), que podem ser divididas em cinco variantes (I, II, III, IV e V). A expressão destas fimbrias é mediada por um ativador transcricional, codificado pelo gene plasmidial *aggR* (DUDLEY et al., 2006). Estudos mais recentes usam o termo EAEC típica para cepas que possuem o gene *aggR* e EAEC atípica para aquelas que não possuem este gene (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Os chamados heteropatotipos de *E. coli*, representados por cepas chamadas híbridas, têm ganhado reconhecimento no mundo (SANTOS et al., 2020). Um notável surto ocorrido na Alemanha, em 2011, provocado pela cepa híbrida EAEC/STEC ou EASTEC, inicialmente foi considerada uma STEC, porém, após caracterização genética, também se mostrou relacionada ao patotipo EAEC (BIELASZEWSKA et al., 2011). Esta cepa EASTEC de sorotipo O104:H4 se manifestou de forma agressiva neste surto, onde houve 4.321 casos confirmados em indivíduos de 16 países diferentes, mais de 900 pacientes desenvolveram SHU e dentre estes, 50 foram a óbito. A fonte de infecção mais provável foi atribuída ao consumo de brotos de alfafa, com sementes de origem egípcia (GRAD et al., 2012).

1.2.4 *E. coli* enterotoxigênica - ETEC

ETEC é um patotipo de distribuição mundial e importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento, além de ser conhecido como agente etiológico da diarreia dos viajantes (QADRI et al., 2005). ETEC é um patotipo importante em animais, principalmente suínos e aves, porém são cepas espécie específicas, assim determinadas pelas adesinas. (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2019). ETEC é definido pela sua capacidade de produzir enterotoxina termolábeis (LT-I e LT-II) e/ou termoestáveis (STa e STb), além de carrear um diverso conjunto de fatores de colonização (CFs) para a aderência ao epitélio intestinal, que podem se ligar a diferentes receptores nas células hospedeiras. As LT são uma classe de enterotoxinas intimamente relacionadas, estrutural e funcionalmente, com a enterotoxina expressa por *Vibrio cholerae* (SPANGLER, 1992). A colonização do epitélio intestinal é mediada por CFs, que podem ser antígenos de fatores de colonização (CFAs), antígenos de superfície de coli (CSs). Essas estruturas de superfície podem ser fimbriais, afimbriais, helicoidais, ou fibrilares e são codificadas principalmente em plasmídeos de virulência (QADRI et al., 2005).

1.2.5 *E. coli* enteroinvasiva - EIEC

EIEC e *Shigella* spp. possuem estreita relação bioquímica, genética e patológica. Muitos estudos demonstram que *Shigella* e *E. coli* são taxonomicamente indistinguíveis a nível de espécie, no entanto, a nomenclatura distinta ainda é mantida devido à importância clínica que a *Shigella* representa (PUPO; LAN; REEVES, 2000). O repertório de virulência da EIEC e *Shigella* está relacionado à aquisição do plasmídeo de invasão pINV e de outros elementos genéticos móveis (EGMs) de origem cromossômica (JOHNSON; NOLAN; 2009; SCHROEDER; HILBI, 2008), como as ilhas de patogenicidade de *Shigella* (SHIs) SHI-1, SHI-2, SHI-O e SRL (*Shigella* resistance locus), sendo as SHI-1 e SHI-2 responsáveis pela codificação das enterotoxinas 1 e 2 de *Shigella* (ShET-1 e ShET-2) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Ambos são patógenos intracelulares facultativos e agentes etiológicos da disenteria bacilar e shigelose. EIEC pode causar uma colite inflamatória invasiva e, ocasionalmente, disenteria, mas na maioria dos casos EIEC provoca diarreia aquosa, a qual é praticamente indistinguível daquela provocada por infecções relacionadas a outros patotipos de *E. coli* (NATARO; KAPER, 1998). EIEC exibe virulência reduzida em comparação à

Shigella, incluindo expressão reduzida de genes de virulência, eliminação de macrófagos menos eficiente, propagação de célula a célula reduzida e diminuição da indução de uma resposta pró-inflamatória do hospedeiro (BANDO et al., 2010).

1.2.6 *E. coli* aderência difusa - DAEC

DAEC é um patotipo intestinal de *E. coli* que foi classicamente definido por sua aderência difusa (DA) em células epiteliais HEp-2, onde a adesão bacteriana ocorre de forma espalhada na superfície da célula hospedeira (BALDINI et al., 1983). O patotipo DAEC é conhecido por carrear adesinas da classe Afa/Dr, que inclui adesinas fimbriais e não fimbriais. Nas microvilosidades, estas adesinas se ligam ao fator de aceleração do decaimento (DAF), uma molécula altamente expressa na superfície apical de células epiteliais. Após a ligação, o rearranjo do citoesqueleto é induzido, provocando destruição e/ou deformação da borda em escova (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). DAEC está associado à diarreia aquosa que pode se tornar persistente em crianças menores de cinco anos, com o aumento da gravidade da doença dos 18 meses aos cinco anos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LE BOUGUÉNEC, 1999). Acredita-se que adultos mais velhos se tornem portadores assintomáticos e especula-se que a infecção por DAEC pode levar a doenças intestinais inflamatórias crônicas, como Doença de Crohn (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). A Doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal, que pode ser causada por uma combinação de fatores que vão desde fatores genéticos, ambientais, microbiota intestinal e influência de patógenos intestinais. Acredita-se que adultos assintomáticos se tornem carreadores de DAEC, no entanto, informações epidemiológicas acerca de um reservatório primário desde patógeno são escassas (CROXEN et al., 2013).

1.2.7 *E. coli* invasiva aderente - AIEC

AIEC também é um dos patotipos de *E. coli* relacionados à Doença de Crohn. AIEC não expressa os fatores de virulência específicos, encontrados em várias outras cepas patogênicas de *E. coli* e a base genética para seu fenótipo pró-inflamatório e invasivo não é totalmente compreendida (NASH et al., 2010). Embora não exista um determinante genético que defina este patotipo, alguns potenciais genes de virulência têm sido relacionados à AIEC através de *whole genome sequencing* (WGS), como o sistema de secreção tipo IV, geralmente usado por bactérias Gram-negativas para o exportar proteínas através do envelope celular.

Também adesinas fimbriais, como a pili do tipo I (FimH) e fimbria polar longa (LPF), que são importantes na adesão e invasão do epitélio intestinal (PALMELA et al., 2018). Assim como os diversos patotipos de InPEC, AIEC possui uma ampla variedade de sorotipos O:H, sendo os sorogrupos O6 e O22 os mais encontrados (MARTINEZ-MEDINA et al., 2009). As cepas AIEC são agrupadas no grupo filogenético B2 e estão relacionadas a cepas ExPEC associadas a infecções do trato urinário e quadros de meningite neonatal (NMEC) (MARTINEZ-MEDINA et al., 2009).

1.3 Fatores de virulência de STEC

1.3.1 Toxina Shiga

A produção da toxina Shiga (Stx) é a principal característica das STEC. As toxinas da família Stx possuem uma configuração molecular AB₅, que consiste em uma única subunidade A associada à subunidade B, composta por um homopentâmero (FRASER et al., 2004). A ligação da toxina à célula hospedeira é mediada pela subunidade B, que se liga a receptores glicolipídicos Gb3 (globotriaosilceramida). Já foi demonstrado que a subunidade B possui mais de 15 potenciais sítios de ligação a receptores glicolipídicos, o que sugere que as Stx tenham uma efetiva ligação cruzada com as células-alvo (BAST et al., 1999; LING et al., 1998). Já a atividade enzimática da Stx está associada à subunidade A, a qual é internalizada e clivada em duas partes, o componente A1 se liga ao ribossomo, interrompendo a síntese proteica e levando à morte celular (LEE; TESH, 2019).

Os genes que codificam Stx são carregados por fagos temperados inseridos no genoma bacteriano, portanto a produção de Stx está diretamente ligada à indução e/ou progressão do ciclo lítico do bacteriófago (NEELY; FRIEDMAN, 1998; O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001). Esta toxina pode ser classificada em dois tipos principais: Stx1 e Stx2. Atualmente, os dois principais tipos de Stx somados possuem 14 subtipos, sendo três subtipos de Stx1 (Stx1a, Stx1c e Stx1d) e dez subtipos de Stx2 (Stx2a - Stx2k) (HUGHES et al., 2020; WERBER; SCHEUTZ, 2019). STEC pode carrear apenas uma variante (Stx1 ou Stx2), ambas as variantes (Stx1 e Stx2), ou combinações de subtipos de Stx1 e Stx2 (ex.: Stx2a e Stx2c; Stx1a e Stx1c). O tipo Stx2 é o mais associado a casos de doença severa, sobretudo os subtipos Stx2c e Stx2d (OMS, 2018). Entretanto, cepas contendo Stx1 também podem levar ao quadro de SHU.

Além da Stx, STEC possui outros fatores de virulência associados a EGMs, como plasmídeos e ilhas de patogenicidade (ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013; IMAMOVIC et al., 2010). Apesar de diversos sorotipos de STEC produzirem Stx, a maioria dos grandes surtos e dos casos de CH e SHU são associados a cepas STEC pertencentes ao sorogrupo O157 (BRANDAL et al., 2015).

1.3.2 Outras toxinas de STEC

Dentre outras toxinas associadas à virulência de STEC está a citotoxina subtilase (SubA), codificada pelo gene *subA*, que cliva fator de estresse celular no retículo endoplasmático, levando à morte celular. Originalmente *subA* foi identificado em um plasmídeo de STEC O113:H21, porém também já foi descrito em uma ilha de patogenicidade (PAI) em outras cepas STEC de sorogrupos não-O113 (MICHELACCI et al., 2013; TOZZOLI et al., 2010).

A enterotoxina termoestável enteroagregativa (EAST1) (codificada pelo gene *astA*) está presente na maioria das EAEC, no entanto, esta toxina se encontra presente em diversos patotipos de *E. coli*, inclusive STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VEILLEUX; DUBREUIL, 2005). Outra importante toxina é a toxina citoletal distensora (Cdt), responsável por provocar danos ao DNA (TAIEB et al., 2016). Em estudo conduzido por Bielazewska e colaboradores (2005) foi confirmada a capacidade de uma variante da toxina Cdt (Cdt-V) de induzir parada no ciclo celular em células endoteliais e contribuir para a SHU.

1.3.3 *Locus of enterocyte effacement* - locus LEE

STEC e EPEC compartilham fatores de virulência, exemplificados principalmente pelo locus LEE, localizado em uma PAI. Os genes da região LEE codificam uma adesina não fimbrial (intimina), codificada pelo gene *eae* e seu respectivo receptor (Tir), codificado pelo gene *tir*, além de um sistema de secreção do tipo III (T3SS) responsável pela injeção de proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e chaperoninas (Ces) no epitélio intestinal hospedeiro induzindo o desenvolvimento da lesão A/E (NATARO; KAPER, 1998). Esta lesão resulta na degeneração da borda em escova de microvilosidades dos enterócitos, em conjunto com o surgimento de estruturas semelhantes a pedestais, devido à polimerização de filamentos de actina nos locais onde há adesão bacteriana (CROXEN et al., 2013; HERNANDES et al., 2009). Além da região LEE, STEC

possui outras PAIs cromossômicas e diversos genes plasmidiais associados à doença em humanos (PATON et al., 2001).

1.3.4 Enterohemolisina

A Enterohemolisina (Ehly) é uma hemolisina formadora de poros na membrana de eritrócitos e outras células, que levam à lise celular. Também pode induzir a apoptose e resposta inflamatória (BIELASZEWSKA et al., 2014). A Ehly foi descrita por Beutin e colaboradores (1989) ao observar que grande parte das cepas STEC apresentavam um fenótipo hemolítico fora do padrão associado à alfa-hemólise de *E. coli* apresentando pequenos e turvos halos de hemólise em ágar sangue lavado de carneiro. O gene *ehxA*, que codifica a Ehly foi descrito no plasmídeo pO157 de 60 MDa, presente na cepa EDL 933, enquanto o gene *hlyA*, que codifica a alfa-hemolisina tem origem cromossômica (AMEZQUITA-LOPEZ et al., 2018).

1.3.5 Fímbrias e outras adesinas

As cepas STEC expressam uma variedade de adesinas fimbriais e não-fimbriais que têm um papel fundamental na colonização, persistência no reservatório animal e na formação de biofilme em outras superfícies celulares.

A subunidade formadora de um pilus tipo IV, PilS, codificada pelo plasmídeo pO113, não aparenta estar envolvida na aderência em células Hep-2, porém está presente em diversas cepas STEC LEE-negativas (SRIMANOTE; PATON; PATON, 2002).

Fímbrias como Elf (*E. coli YcbQ laminin-binding fimbriae*) e Lpf (*long polar fimbriae*) contribuem para o potencial de colonização com a aderência à matriz extracelular (FARFAN; TORRES, 2012; SAMADDER et al., 2009). Assim como o pilus tipo IV Hcp (*hemorrhagic coli pilus*), encontrado em STEC O157:H7, responsável por formar longas fibras coesas capazes de se aderir a proteínas da matriz extracelular em células epiteliais. O pilus Hcp também possui outras funções como motilidade por translocação e participação na invasão celular *in vitro* (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2009).

Dentre outras proteínas envolvidas na adesão celular de STEC LEE-positivas está a Efa-1/LifA (fator para aderência de *E. coli* / linfostatina) e seu homólogo, ToxB (adesina homóloga à Efa-1/LifA), que usam o aparato do T3SS para serem secretadas (TATSUNO et al., 2001).

A adesina Iha (adesina homóloga à IrgA de *Vibrio cholerae*), encontrada em STEC LEE-negativas, é encontrada em uma PAI com resistência à telurito (TARR et al., 2000). A adesina autoaglutinante de STEC (Saa) (codificada pelo gene *saa*) identificada em uma STEC O113:H21 e a proteína autotransportadora (Sab), são encontradas em cepas STEC LEE-negativas e contribuem para a adesão e colonização na célula hospedeira (HEROLD; PATON; PATON, 2009). O autotransportador ligante de cálcio homólogo ao antígeno 43 (Cah) também contribui para a agregação celular, mas seu papel efetivo na colonização intestinal não é conhecido (VAN DER WOUDE; HENDERSON, 2008).

1.4 Sorotipos de STEC

A sorotipagem clássica é baseada no esquema de classificação de Kauffman-White, onde os polissacarídeos O (somáticos) e os antígenos de superfície H (flagelares) são determinados. Uma designação de NM ou H- indica a ausência do antígeno H, ou seja, o isolado não possui motilidade (NATARO; KAPER, 1998). Métodos moleculares, como PCR de genes envolvidos na biogênese do antígeno O, neste caso os genes *rfb*, *wzx* e *wzy*, como o gene *fliC* para o antígeno H, também podem ser usados para a identificação do sorotipo.

Atualmente existem 186 antígenos O de *E. coli* e 53 antígenos H reconhecidos. (FRATAMICO et al., 2016). Estima-se que existam em torno de 470 sorotipos STEC descritos (MORA et al., 2012), no entanto, apenas um subconjunto foi relatado em casos de doença humana. O número estimado de sorotipos STEC associados à doença varia de >60 (BETTELHEIM, 2003) a >100 (JOHNSON, THORPE, SEARS, 2006).

Desde a sua primeira detecção como agente de doença humana em 1982 nos Estados Unidos, sendo neste caso associado ao sorotipo O157:H7 (que continua sendo o mais frequente em surtos e casos graves), o patotipo STEC tem sido, a nível mundial, objeto de inúmeros estudos associados à sua ocorrência e virulência. Porém outros sorotipos STEC não-O157 possuem relevante importância no aumento do número de casos esporádicos e surtos no mundo como: O26, O45, O103, O111, O121 e O145 descritos como “*big-six non-STEC O157:H7*”, como também o sorotipo O113 *eae* negativo (CROXEN et al., 2013).

Embora a sorotipagem seja informativa para certos patotipos (por exemplo, STEC O157:H7), nem sempre é útil para outros, devido a algumas cepas não serem tipáveis ou apresentarem reatividade cruzada entre antígenos (CROXEN et al., 2013).

1.5 Agrupamento filogenético de *E. coli*

No início dos anos 1980, Whittam e colaboradores (1983), através da técnica de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), demonstraram a existência de uma subestrutura genética em *E. coli*, designada pelos filogrupos A, B1, B2 e D. Onde as cepas *E. coli* responsáveis por infecções extraintestinais foram mais relacionadas aos filogrupos B2 ou D, que ao A ou B1 (PICARD et al., 1999; JOHSON, STELL, 2000). O significado clínico dessas observações sugeriu que um método simples de atribuição de cepas *E. coli* a um filogrupo específico seria epidemiologicamente valioso. A partir deste pressuposto foi desenvolvido um método de identificação, posteriormente chamado, “método Clermont”. Este método consiste em um ensaio de PCR baseado na detecção de dois genes (*chuA* - gene envolvido no transporte de heme descrito em O157:H7 e *yjaA* - gene de resposta ao estresse celular descrito em *E. coli* K-12) e um fragmento de DNA (TspE4.C2 - gene relacionado à enzima lipase esterase), que possibilitou classificar cepas *E. coli* nos quatro filogrupos: A, B1, B2 e D.

A tipagem filogenética, ao utilizar a técnica de PCR, tornou-se amplamente utilizada devido à sua simplicidade e rapidez (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). No entanto, à medida que os bancos de dados de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) se expandiram, também aumentou o volume de dados de WGS, o que sugeriu fortemente que *E. coli* não consistisse em apenas quatro filogrupos (CLERMONT, GORDON, DEMANUR, 2015). Consequentemente, o método de PCR triplex foi aprimorado com a adição do gene *arpA* (gene codificador da Proteína A de repetição de anquirina), tornado-se um PCR quadruplex, que juntamente com dois PCR alelo-específicos (para os filogrupos C e E), permitiu o delineamento de oito filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F e *E. coli* Clade I) (CLERMONT et al., 2013).

Estudos de tipagem filogenética têm mostrado que cepas relacionadas a filogrupos específicos podem estar relacionados à origem destas cepas (CLERMONT et al., 2013). De modo que os filogrupos A e B2 são mais comuns em humanos, sendo B1 e D menos prevalentes. Já as cepas *E. coli* de origem animal estão mais relacionadas ao filogrupo B1, seguido, em menor frequência, dos filogrupos A, B2 e D (CLERMONT et al., 2015).

Resumidamente, o emprego da técnica de PCR tem se mostrado muito útil como um instrumento alternativo de classificação filogenética de populações de *E. coli*, proporcionando relevantes esclarecimentos sobre a virulência e relação entre os patótipos de *E. coli*.

1.6 Relevância da tipificação molecular de STEC através de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é uma técnica de tipagem molecular baseada no estudo da diversidade genética através da similaridade cromossômica. Com o auxílio de *softwares* específicos é possível investigar as relações de clonalidade entre diferentes cepas de uma mesma espécie, o que contribui para a elucidação de casos de surtos, onde é possível determinar prováveis fontes de infecção, seja a nível hospitalar ou comunitário (CDC, 2016).

Devido ao seu poder discriminatório e alta concordância com parentesco genético entre as cepas investigadas, o protocolo de PFGE foi considerado até 2019, o protocolo “padrão ouro” para a investigação de surtos de *E. coli* patogênica, em especial *E. coli* O157:H7 e outros sorotipos STEC de importância clínica, como as STEC pertencentes ao grupo *Big-six* STEC não-O157 (CDC, 2016). Desde 2019, o WGS foi adotado como protocolo “padrão ouro” para investigação de surtos (CDC, 2019).

Por mais de 20 anos, a rede PulseNet utilizou o PFGE para a detecção e resolução de surtos provocados por doenças transmitidas por alimentos. Em média, cerca de 270.000 casos de doença foram prevenidos e pelo menos 500 milhões de dólares foram economizados anualmente desde o uso do PFGE nos EUA (CDC, 2019).

1.7 Aspectos da legislação sanitária brasileira relacionados à *E. coli* e STEC

No Brasil, a RDC nº 331, que dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação, determina o cumprimento dos padrões microbiológicos estabelecidos na Instrução Normativa nº 60, ambas publicadas em 23 de dezembro de 2019 (ANVISA, 2019), revogando a RDC nº 12 (ANVISA, 2001).

Dentre as principais modificações relacionadas à *E. coli*, incluídas na IN 60/2019, citam-se a substituição de “coliformes a 45 °C” por “*E. coli*” e a inclusão da contagem de Enterobacteriaceae. Apesar de dois importantes sorotipos de *Salmonella* associados a casos de intoxicação alimentar, como *S. enteritidis* e *S. typhimurium* terem sido incluídos na RDC vigente, nenhum patotipo ou sorotipo específico de STEC foi mencionado.

No entanto, a Instrução Normativa Nº60 de 20 de dezembro de 2018 (MAPA, 2018) determina a pesquisa de STEC em carne bovina em abatedouros frigoríficos, bem como a identificação do sorotipo O157:H7 e dos sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145, por serem considerados de alto risco para a saúde pública.

1.8 Epidemiologia de STEC

STEC vêm sendo investigada no Brasil basicamente desde a sua primeira descrição nos EUA, principalmente após o primeiro surto ligado ao sorotipo O157:H7 relacionado ao consumo de hambúrgueres contaminados (RILEY et al., 1983). No Brasil, em especial no estado do Rio de Janeiro, relatos de baixa ocorrência de STEC em humanos contrastam com a elevada ocorrência em reservatório animal e alimentos de origem cárnea, tanto em estudos na década de 1990 quanto em estudos atuais (CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997; GONZALEZ et al., 2016). STEC também têm sido isoladas em bovinos em outras regiões do país, como Centro-Oeste, Sul e Nordeste (CASTRO et al., 2019).

STEC é prevalente no país vizinho, Argentina, descrito pela literatura como país de maior índice mundial de SHU em crianças com menos de cinco anos (RIVERO et al., 2010; ORI et al., 2018). Este fato está relacionado à exposição excessiva ao principal fator de risco associado à STEC, que é o consumo de carne de origem bovina malpassada (BENTANCOR et al., 2012). Em contraste, o Brasil possui baixas incidências de quadros de SHU por *E. coli* e casos de STEC O157:H7 são incomuns, enquanto em outros países em desenvolvimento infecções por STEC são mais identificadas, onde a vigilância sanitária e diagnóstico clínicos carecem (CROXEN et al., 2013).

De modo geral, a ocorrência de STEC é elevada no reservatório animal (principalmente bovinos) e variável em alimentos, sendo mais frequente em produtos cárneos de origem bovina. A doença humana tem distribuição mundial, no entanto, em países de clima temperado e/ou do hemisfério Norte há uma maior ocorrência de casos (KARMALI, 2016; OMS, 2018). A persistência de STEC em bovinos, em elevada frequência ao longo de sua vida, sugere que estas apresentem uma estratégia eficiente de colonização de longo tempo nos animais e/ou que resistam por um período considerável no ambiente, permitindo assim, sucessivas re-contaminações (CASTRO et al., 2017; CHEKABAB et al., 2013).

A presença de uma grande variedade de marcadores de virulência é uma característica das STEC, o que é possível graças aos mecanismos de transferência de EGMs. No entanto, apesar desta grande variabilidade, muitas cepas de STEC apresentam grande similaridade genética, especialmente dentro de grupos clonais. Este fato pode ser observado pela caracterização genética de cepas STEC relatadas em diferentes períodos, onde flutuações ou manutenção das taxas de ocorrência de vários marcadores de virulência, genéticos e fenotípicos foram avaliados (CAVALCANTI et al., 2020; DIODATI et al., 2015; MIKO et al., 2013; VAZ et al., 2004).

1.9 Justificativa

A vigilância e o controle de STEC tornaram-se um dos principais focos das autoridades de saúde pública no mundo. Embora o foco inicial tenha sido colocado na detecção do sorotipo O157:H7, tornou-se evidente que sorotipos STEC não-O157 contribuem de maneira expressiva para casos esporádicos e surtos. Os quadros clínicos, como diarreia sanguinolenta, CH e SHU, provocados pela infecção por STEC, reforçam a necessidade de seu estudo, pois em casos graves, como na SHU, o paciente pode sofrer falência renal aguda, o que pode resultar em óbito ou dano renal crônico (RIVAS, CHINEN, GUTH, 2016).

A investigação do perfil de virulência e caracterização de cepas STEC isoladas de bovinos e produtos cárneos derivados é importante para possibilitar uma melhor compreensão deste patógeno veiculado por alimentos, no contexto da vigilância epidemiológica. Assim, este tipo de estudo pode auxiliar o monitoramento epidemiológico e fornecer dados para a adoção de medidas preventivas, com o objetivo de reduzir os riscos à saúde do consumidor.

A detecção de alterações nos perfis de virulência é essencial para a elaboração de políticas públicas de saúde e monitoramento de patógenos. Tendo em vista a relevância de STEC no cenário mundial, este estudo visa atender à crescente demanda por dados relacionados à ocorrência, persistência e perfil de virulência de cepas STEC potencialmente patogênicas ao homem no Brasil, sendo necessário para isso, um monitoramento epidemiológico constante devido ao considerável impacto deste patógeno à saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral a avaliação comparativa da virulência e diversidade genética de cepas STEC isoladas de animais e alimentos no estado do Rio de Janeiro em dois períodos, com um intervalo de isolamento de até 25 anos (1989 a 1995 e 2012 a 2014).

2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a presença de marcadores genéticos de virulência;
- b) Avaliar a produção fenotípica de biofilme;
- c) Avaliar a produção fenotípica de enterohemolisina;
- d) Investigar a relação entre as cepas através de sorotipagem e filotipagem;
- e) Avaliar a similaridade genética das cepas STEC isoladas nos dois períodos apresentando sorotipos associados à doença humana, através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e isolamento das cepas STEC

Foram estudadas 38 cepas STEC, isoladas de bovinos e produtos cárneos bovinos entre 1989 e 1995, compondo o grupo aqui denominado P1 (CERQUEIRA et al., 1999; CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997), e 37 cepas STEC provenientes de bovinos de duas propriedades rurais de dois municípios do estado do Rio de Janeiro (Miracema e Cachoeiras de Macacu), isoladas entre 2012 e 2014, compondo o grupo aqui denominado de P2 (Tabelas 1 e 2). As cepas deste estudo fazem parte do conjunto de cepas de patótipos de *E. coli* mantido pelo Laboratório de Enteropatógenos, Microbiologia Veterinária, Ambiental e de Alimentos (LEMA), estocadas a -20 °C em caldo triptona de soja - TSB (Kasvi, Brasil) com 20% de Glicerol.

As estratégias de recuperação e isolamento das cepas variaram em função da origem e do período de coleta. O isolamento das cepas STEC a partir de produtos cárneos bovinos do grupo P1 seguiu o protocolo à época recomendado pelo *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) para patótipos de *E. coli* em alimentos (HITCHINS et al., 1992). A detecção e a identificação de STEC dentre os isolados de *E. coli* foram feitas por meio da investigação de citotoxicidade em células Vero, seguida da neutralização deste efeito a partir da utilização de anticorpos para distinção do tipo toxigênico e a confirmação se deu através da hibridização com sondas genéticas (GENTRY; DALRYMPLE, 1980; GIRALDI; GUTH; TRABULSI, 1990).

As cepas do grupo P1 oriundas de bovinos foram isoladas a partir de suspensão polimicrobiana das amostras fecais obtidas após o crescimento em meio não seletivo. O critério de triagem inicial foi realizado com ensaios de PCR destas suspensões e posteriores ensaios com até 500 colônias típicas de *E. coli*. A confirmação bioquímica de espécie foi realizada com todas as cepas STEC detectadas. As cepas de origem bovina do grupo P2 foram recuperadas de modo semelhante às do grupo P1, variando apenas os iniciadores de PCR utilizados (CERQUEIRA et al., 1999).

A sorotipagem das cepas foi realizada na Universidade Federal de São Paulo (grupo P1) e no Instituto Adolpho Lutz (grupo P2) por meio de testes de aglutinação, conforme descrito por Guinée e colaboradores (1981), empregando antissoros O (O1 a O181) e H (H1 a H56).

A pureza e identificação de todas as cepas estocadas foi confirmada neste estudo. Para a realização dos testes, os estoques das cepas foram reativados pela inoculação e crescimento em meio líquido TSB, sendo mantidos estoques temporários (de uso) em meio sólido ágar triptona de soja - TSA (Kasvi, Brasil).

3.2 Investigação de marcadores de virulência de STEC

Ensaio de PCR foram realizados para amplificação dos genes cromossômicos *stx1*, *stx2*, *eae*, *iha*, *astA* e dos genes plasmidiais *ehxA*, *saa*, *subA*, *pilS* e *toxB* utilizando como DNA molde extração proveniente de cada isolamento. As reações de PCR realizadas seguiram protocolos descritos por China; Pirson; Mainil, (1996) – *stx1*, *stx2* e *eae*; Johnson et al. (2005) – *iha*; (Yamamoto; Echeverría (1996) – *astA*; (Paton & Paton (1998, 2005, 2001) - *ehxA*, *saa*, *subA*; Dr. Alexandre Belo – UERJ (não publicado) – *pilS*; Tataczak et al. (2005) – *toxB*, descritas no Quadro 1.

3.3 Produção de enterohemolisina

A expressão do fenótipo enterohemolítico foi investigada após crescimento das cepas em meio líquido TSB durante 6 horas, a 37 °C. Após este período, uma alíquota de 5 µL do crescimento microbiano foi inoculada, em forma de *spot*, em placas de ágar sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes em tampão fosfato-salino - PBS (estéril e acrescido de CaCl₂ a 10 mM).

A primeira leitura para observação da produção de α -hemolisina foi realizada com 3 horas de incubação, a 37 °C; enquanto a segunda leitura, para a observação da produção de enterohemolisina, foi feita após 18 horas, a 37 °C (BEUTIN et al., 1989). As cepas-controle usadas nos testes foram *E. coli* DH5 α (não hemolítica), *E. coli* U4-41 (α -hemolítica) e *E. coli* C3888 (enterohemolítica).

3.4 Avaliação da formação de biofilme

3.4.1 Teste em Ágar Vermelho Congo (CRA) para detecção de fimbria curli de *E. coli*

Uma alíquota de 5µL do crescimento das cepas em meio TSB (24 horas, a 37 °C) foi inoculada, em *spot*, em placas de Ágar vermelho Congo (caldo nutritivo acrescido com 1,5%

de Ágar e suplementado de 40 mg/L de vermelho Congo e 20 mg/L de azul brilhante de Coomassie) e incubada a 25 °C por 48 horas. Colônias que apresentaram cor avermelhada e escura foram classificadas como produtoras de fimbria curli, enquanto colônias brancas ou rosadas foram classificadas como não produtoras (CASTONGUAY et al., 2006). As cepas *E. coli* O42 e DH5- α foram utilizadas nos testes como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.4.2 Teste de adesão em microplacas de poliestireno

A padronização do inóculo das cepas para os testes foi realizada por comparação e ajuste do seu crescimento por 24 horas a 37 °C em meio TSB através da verificação da sua densidade óptica (D.O.). Um volume de 180 μ L do crescimento bacteriano em TSB foi pipetado em tubos de solução salina (NaCl a 0,85%), seguido de comparação à turbidez de 0,5 na escala McFarland. A densidade óptica de cada tubo de TSB foi mensurada no espectrofotômetro ao comprimento de onda de 590 nm. A partir do valor da D.O. de cada cepa, foi calculado o volume do inóculo através da seguinte fórmula: $y = 0,9/D.O.$, onde y é o volume (μ L) a ser pipetado no poço, sendo necessário completar com TSB até o volume final de 200 μ L.

Após 48 horas de incubação a 37 °C, o meio foi removido e as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de solução salina tamponada (PBS; pH 7,2) estéril a fim de remover bactérias fracamente aderidas à placa, e então secadas em estufa a 65 °C durante 45 minutos, para a fixação das bactérias aderidas. A coloração das bactérias foi feita pela adição em cada poço de 150 μ L de uma solução de Cristal Violeta a 1%, mantida por 30 minutos. Em seguida, as placas foram delicadamente lavadas com água destilada até que não fosse mais possível a visualização do corante.

A análise quantitativa estimada da formação de biofilme foi realizada por adição de 150 μ L de etanol a 95% para descorar os poços e a absorbância (A) do cristal violeta presente na solução descorante foi mensurada usando um leitor de microplacas com comprimento de onda de 595 nm. O ensaio de avaliação de biofilme em microplacas foi realizado em triplicata para todas as cepas. As médias e desvios padrão foram calculadas para todos os experimentos (DJORDJEVIC, 2002).

As cepas foram classificadas segundo Stepanovic e colaboradores (2004), por comparação da D.O. da cepa (A) com a D.O. do meio não inoculado (Ac), do seguinte modo: se $A \leq Ac$ (controle não inoculado) = não produção de biofilme; se $Ac < A \leq (2 \times Ac)$ = fraca

produção de biofilme; se $(2 \times Ac) < A \leq (4 \times Ac)$ = produção moderada de biofilme e se $(4 \times Ac) < A$ = forte produção de biofilme.

Quadro 1 - Iniciadores dos genes de virulência utilizados nos ensaios de PCR

Genes	Iniciadores (5' to 3')	Produto (pb)	Referências
<i>stx1</i>	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G TTG CCC CCA GAG TGG ATG	388	CHINA, PIRSON & MAINIL, 1996 (modificado pelo grupo)
<i>stx2</i>	TGG GTT TTT CTT CGG TAT C GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT	807	CHINA, PIRSON & MAINIL, 1996 (modificado pelo grupo)
<i>ehxA</i>	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC AAT GAC CCA AGC TGG TTA AGC	534	PATON & PATON, 1998
<i>toxB</i>	ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C	602	TATARCZAK et al 2005
<i>Saa</i>	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC ATG GAC ATG CCT GTC GCA AC	119	PATON & PATON, 2002 (modificado pelo grupo)
<i>pilS</i>	TGA ACT TCA GAG CAC GTC TGT C TCG CTA CTG CAG ACG GTA AC	502	DR. ALEXANDRE BELO – DMIP – UERJ (não publicado)
<i>subA</i>	TAT GGC TTC CCT CAT TGC C TAT AGC TGT TGC TTC TGA CG	556	PATON & PATON, 2005 (modificado pelo grupo)
<i>Iha</i>	CTG GCG GAG GCT CTG AGA TCA TCC TTA AGC TCC CGC GGC TGA	1305	JOHNSON et al, 2005.
<i>Eae</i>	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	570	CHINA, PIRSON & MAINIL, 1996 (modificado pelo grupo)
<i>astA</i>	CCA TCA ACA CAG TAT AT GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	111	YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996.

pb: pares de base.
Fonte: O autor, 2020

3.5 Filotipagem

A determinação dos filogrupos foi realizada por ensaios de PCR segundo esquema de oito filogrupos proposto por Clermont e colaboradores (2013). Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume de 20 μ L contendo 2 ml de tampão 10X (fornecido no kit da Taq polimerase), 2 μ M de cada dNTP, 2 U de Taq polimerase, 2 μ L de DNA (aproximadamente 100 ng/ μ L) e os iniciadores apropriados em quantidade de 20 pmol, exceto para AceK.f (40 pmol), ArpA1.r (40 pmol), trpBA.f (12 pmol) e trpBA.r (12 pmol).

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação 4 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 5 segundos a 94 °C e 20 segundos a 57 °C (grupo E) ou 59 °C (quadruplex e grupo C) e um etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os pares de primers usados para identificar os filogrupos específicos E e C foram ArpAgpE.f e ArpAgpE.r e trpAgpC.f e trpAgpC.r, respectivamente (Lescat et al., 2012). Em reações de PCR específicas para E e C, os iniciadores trpBA.f e trpBA.r foram adicionados para fornecer um controle interno (CLERMONT et al., 2013).

3.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A metodologia utilizada foi desenvolvida conforme o procedimento operacional padrão estabelecido pela rede PulseNet para PFGE de *E. coli* O157:H7, *E. coli* não-O157 (STEC), sorotipos de *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* (RIBOT et al., 2006).

O ensaio de PFGE foi realizado em 14 cepas STEC, tendo como critério de inclusão possuir sorotipos relatados em doença humana e presentes em ambos os grupos, P1 e P2. A cepa padrão de *Salmonella* Braenderup H9812 foi utilizada como controle do tamanho dos fragmentos de restrição.

3.6.1 Montagem dos *plugs* de agarose

O crescimento de 24 horas a 37 °C das cepas em meio sólido TSA foi utilizado para a incorporação em gel de agarose e preparação dos *plugs*. Com o auxílio de alça estéril, uma alíquota do crescimento foi transferida para tubos de 12x100 contendo 2 mL de tampão de suspensão celular (Tris 100 mM; EDTA 100 mM; pH 8,0). A concentração de células na

suspensão foi ajustada para a absorbância igual a 1.0 em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 610 nm.

O ajuste foi feito a partir da diluição da suspensão no tubo ou do acréscimo de mais crescimento bacteriano à suspensão. Duzentos microlitros da suspensão ajustada, em temperatura ambiente, foram transferidos para um microtubo com 10 μ L de Proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, 200 μ L de agarose a 1% previamente preparada e mantida a 55 °C em banho-maria, foram adicionados ao microtubo, novamente homogeneizados e, rapidamente, transferidos para o molde dos *plugs*.

3.6.2 Processo de lise celular nos *plugs*

Após total polimerização da agarose nos moldes, os *plugs* foram transferidos delicadamente, com o auxílio de uma espátula de metal, para tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular (Tris 50 mM, EDTA 50 mM [pH 8,0]; Sarcosyl 1%; Proteinase K 20 mg/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria por 18-24 horas a 55 °C sob agitação constante de 175 rpm. Após o período de incubação, os *plugs* foram lavados por quatro vezes com água ultrapura e duas vezes com tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), com intervalos de 15 minutos entre as lavagens. Após as lavagens, os *plugs* foram transferidos para criotubos com 2 mL de tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) e armazenados a 4 °C.

3.6.3 Digestão enzimática do DNA nos *plugs*

A digestão enzimática foi realizada em microtubos contendo a enzima de restrição *Xba*I (10 U/ μ L), o tampão da enzima e água ultrapura em um volume final de 200 μ L. Os *plugs* referentes a cada cepa foram divididos em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm de espessura e transferidos para os microtubos com a solução de digestão e incubados em banho-maria a 37 °C por 4 horas.

3.6.4 Montagem do gel e condições de corrida eletroforética

Após a incubação, a solução de digestão foi aspirada dos microtubos e os *plugs* foram delicadamente posicionados sobre cada um dos pentes de corrida com o auxílio de alça bacteriológica estéril, e para uma melhor fixação, foram adicionados 100 μ L de agarose a 1%

sobre cada *plug*. Ao final, foram acrescentados 100 mL de agarose a 1% e, após a polimerização do gel, o pente foi retirado. Após ser retirado do molde, o gel foi transferido para a cuba de eletroforese do equipamento CHEF DR III (BioRad Inc. Hercules, CA, EUA) já contendo o tampão TBE 1X, previamente refrigerado a 14 °C. A corrida foi realizada em sistema de eletroforese pulsada com resfriamento por 19 horas a 200 V (6V/cm), a 14°C. Após a corrida os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µL/mL) e fotografados sob iluminação UV.

4 RESULTADOS

4.1 Sorotipos e tipos toxigênicos das cepas STEC dos grupos P1 e P2

Os sorotipos e tipos toxigênicos das cepas do grupo P1 previamente investigados, demonstraram a presença de 20 sorotipos distintos dentre as 38 cepas do grupo P1. Em relação aos tipos toxigênicos das cepas, *stx2* esteve presente em 42,1% das cepas (16/38), seguido por *stx1/stx2* (39,5% -15/38) e *stx1* (18,4% - 7/38).

No grupo P2 foram identificados 25 sorotipos distintos dentre as 33 cepas STEC. No que se diz respeito aos tipos toxigênicos, o *stx2* foi o mais comum, estando presente em 51,3% (19/37) das cepas, enquanto *stx1* e *stx1/stx2* foram detectados em apenas 21,6% (8/37) e 27,1% (10/37), respectivamente. Ao se considerar os dois tipos de toxinas apenas, presentes simultaneamente ou não, observou-se que tanto no grupo P1 como no grupo P2 o gene *stx2* foi o mais frequente (81,6% e 72,9%, respectivamente).

De modo geral foram observados 41 sorotipos STEC distintos entre as 75 cepas somando-se os dois grupos, sendo que 14 cepas de sorotipos O113:H21, O82:H8, O22:H16 e R:H19 foram selecionadas para o ensaio de PFGE por atenderem ao critério de possuir representantes em ambos os grupos (P1 e P2) e estarem associadas a casos de doença humana (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Sorotipos, filogrupos e marcadores de virulência de cepas STEC isoladas entre 1989 e 1995 (P1)

Cepa	Tipo Stx	Origem	Sorotipo	Filogrupo	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>pilS</i>	<i>subA</i>	<i>toxB</i>	<i>eae</i>	Ehly	Curli	Biofilme
EC21	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	O46:H38	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	Fraca
EC 23	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	O46:H38	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
EC 56	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	O65:H48	D	+	+	+	+	-	-	-	+	+	Fraca
EC 139	<i>stx1</i>	Alim.	NT:H34	B1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Fraca
EC 182	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	R:H42	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	N
EC 223	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	O116:H21	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	N
EC 233	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	NT:H21	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	N
EC 371	<i>stx1</i>	Alim.	R:H47	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	N
EC 392	<i>stx1</i>	Alim.	O69:H28	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	N
EC 408	<i>stx1</i>	Alim.	R:H7	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	N
EC 506	<i>stx2</i>	Alim.	R:H19	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Fraca
EC 516	<i>stx2</i>	Alim.	NT:H21	B1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	N
EC 519	<i>stx2</i>	Alim.	O116:H21	B1	+	+	+	-	+	-	-	+	+	Fraca
EC 531	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	NT:H21	B1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	Fraca
EC 546	<i>stx2</i>	Alim.	O17/ O77:H18	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
EC 745	<i>stx2</i>	Alim.	NT:H21	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
EC 751	<i>stx2</i>	Alim.	R:H8	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fraca
EC 784	<i>stx2</i>	Alim.	O113:H21	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	Mod
EC 861	<i>stx1/stx2</i>	Alim.	O82:H8	C	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
EC 899	<i>stx1</i>	Alim.	NT:H8	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	N
EC 1214	<i>stx1</i>	Alim.	R:H14	B1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	N
B30	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	R:H21	B1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	N
B47	<i>stx1</i>	Bovino	R:H18	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fraca
B84	<i>stx2</i>	Bovino	R:H8	B1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	N
GC16	<i>stx2</i>	Bovino	R:H21	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	N
GC20	<i>stx2</i>	Bovino	O113:H21	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Fraca
GC137	<i>stx2</i>	Bovino	R:H19	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	N
GC138	<i>stx2</i>	Bovino	O113:H21	B1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	Mod
GC147	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	R:H18	F	+	+	+	+	-	-	-	+	-	N
B1/1d	<i>stx2</i>	Bovino	O157:H7	D	+	-	+	-	-	+	+	+	-	N
B16/2	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O82:H8	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
B18/1d	<i>stx2</i>	Bovino	O157:H7	D	+	-	+	-	-	+	+	+	-	N
B30/5	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	NT:H21	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	N
B55/1	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	R:H19	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Fraca
B63/17	<i>stx2</i>	Bovino	O22:H16	B1	+	-	+	-	-	-	-	+	+	Fraca
GC9/38	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	R:H8	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Fraca
GC53/24	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	R:H19	B1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	Mod
GC148c	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O157:H7	B1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	Fraca

Alim.: alimento; Ehly: enterohemolisina; Mod: produção moderada; N: não produtora.

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 2 - Sorotipos, filogrupos e marcadores de virulência de cepas STEC isoladas entre 2012 e 2014 (P2)

Cepa	Tipo Stx	Origem	Sorotipo	Filogrupo	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>pilS</i>	<i>subA</i>	<i>toxB</i>	<i>eae</i>	Ehly	Curli	Biofilme
M2	<i>stx2</i>	Bovino	O113:H21	B1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	N
M4	<i>stx2</i>	Bovino	ONT:H49	B1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Fraca
M5	<i>stx1</i>	Bovino	O19:H30	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Fraca
M6	<i>stx2</i>	Bovino	O93:H19	B1	+	+	-	-	+	-	-	+	+	N
M9	<i>stx2</i>	Bovino	NR	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	N
M10	<i>stx2</i>	Bovino	O54:H7	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	N
M11	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	ONT:H45	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	N
M12	<i>stx2</i>	Bovino	OR:H19	Desconhecido	-	+	-	-	-	-	-	-	+	N
M15	<i>stx2</i>	Bovino	OR:H10	Desconhecido	-	-	-	+	-	-	-	-	+	N
M17	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	OR:H19	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	N
M18	<i>stx1</i>	Bovino	ONT:H25	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	N
M20	<i>stx1</i>	Bovino	NR	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fraca
M21	<i>stx2</i>	Bovino	O160:H10	Desconhecido	+	-	+	+	+	-	-	+	+	N
M24	<i>stx1</i>	Bovino	O6:H34	B1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	N
CM1	<i>stx1</i>	Bovino	NR	D	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Mod
CM2	<i>stx1</i>	Bovino	OR:H16	B1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	Fraca
CM3	<i>stx2</i>	Bovino	O22:H16	B1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
CM4	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	OR:H16	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
CM5	<i>stx1</i>	Bovino	ONT:H16	B1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
CM6	<i>stx2</i>	Bovino	O74:H23	B1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Fraca
CM7	<i>stx2</i>	Bovino	NR	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	N
CM8	<i>stx1</i>	Bovino	O103:H21	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	N
CM9	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O74:H23	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	Mod
CM11	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O82:H8	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	Fraca
CM12	<i>stx1</i>	Bovino	O141:H49	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	Fraca
CM13	<i>stx2</i>	Bovino	O141:H49	B1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	Mod
CM14	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O22:H16	B1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Fraca
CM15	<i>stx2</i>	Bovino	O141:H49	A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	N
CM16	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O22:H16	D	+	-	+	-	-	-	-	+	+	N
CM17	<i>stx1/stx1</i>	Bovino	O117:H28	B2	-	+	+	+	-	-	-	-	+	N
CM18	<i>stx2</i>	Bovino	O96:H19	D	+	+	+	-	-	-	-	+	+	Fraca
CM19	<i>stx2</i>	Bovino	O113:H21	B1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Fraca
CM20	<i>stx2</i>	Bovino	O8:H16	D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	N
CM21	<i>stx1</i>	Bovino	O2:H25	Clade I	-	-	-	-	-	-	-	-	+	N
CM23	<i>stx1</i>	Bovino	O150:H8	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	N
CM24	<i>stx2</i>	Bovino	O117:H7	B1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	N
CM25	<i>stx1/stx2</i>	Bovino	O91:H16	B1	+	-	+	+	-	-	+	+	+	N

Alim.: alimento; NR: Não realizado; Ehly: enterohemolisina; Mod: produção moderada; N: não produtora.

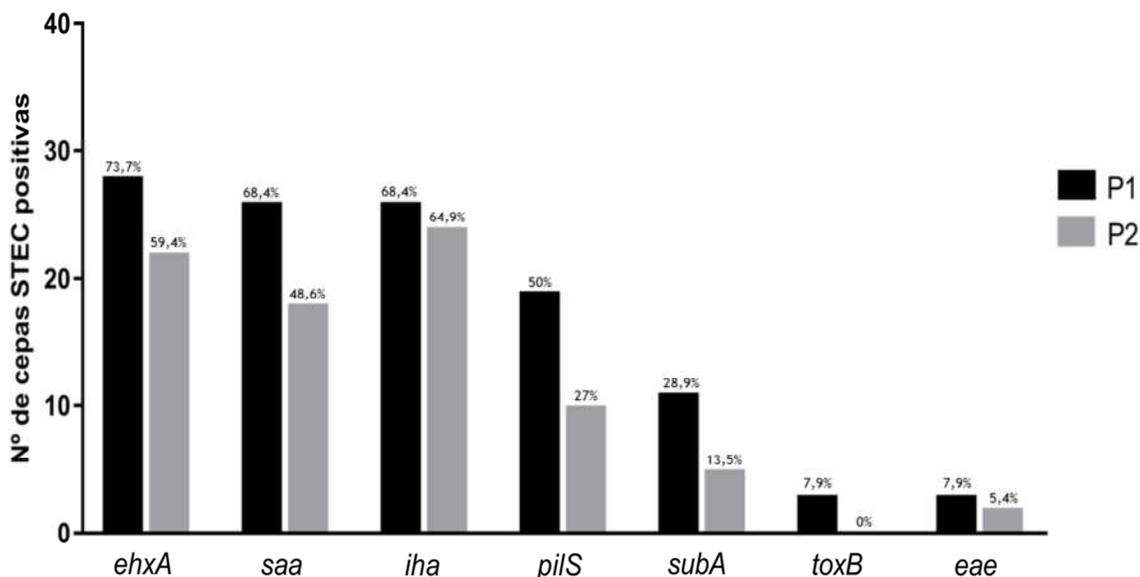
Fonte: O autor, 2020.

4.2 Marcadores de virulência das cepas STEC dos grupos P1 e P2

O gene plasmidial *ehxA* foi o mais detectado no grupo P1, presente em 73,7% (28/38) das cepas, seguido pelos genes *saa* e *iha*, ambos presentes em 68,4% (26/38) das cepas. Os genes *pilS* e *subA* estiveram presentes, respectivamente, em 50% (19/38) e 28,9% (11/38) das cepas. Em menor proporção, *toxB* e *eae* foram positivos para apenas 7,9% (3/38) e 7,9% (3/38) das cepas, respectivamente (Figura 1 e Tabela 1).

Em relação ao grupo P2, o gene mais frequente foi o *iha*, presente em 64,9% (24/37), seguido de *ehxA*, 59,4% (22/37) e *saa*, 48,6% (18/37). Os genes *pilS* e *subA* foram detectados, respectivamente, em 27% (10/37) e 13,5% (5/37) das cepas isoladas. Nenhuma das cepas P2 foi positiva para o gene *toxB*, enquanto 5,4% (2/37) foram positivas para o gene *eae* (Figura 1 e Tabela 2).

Figura 1 - Comparação da ocorrência dos marcadores de virulência entre cepas STEC dos grupos do P1 e P2 por PCR



Fonte: O autor, 2020.

As taxas de ocorrência dos marcadores de virulência entre as 14 cepas selecionadas para o PFGE, seguiram o mesmo padrão de ocorrência observado nas cepas STEC dos grupos P1 e P2. Os genes com maior taxa de ocorrência foram *ehxA* e *iha* (87,5%), seguidos por *saa*, *pilS*, *subA*, com taxas de 78,6%, 64,3% e 35,7%, respectivamente. A presença dos genes *toxB* e *eae* não foi detectada.

Todas as cinco cepas O113:H21 (EC784, GC138, GC20 [P1] e M2, CM19 [P2]) apresentaram o gene *stx2*, incluindo duas cepas com perfil de virulência idêntico (EC784 [P1] e CM19 [P2]). As cepas O82:H8 (B16/2 [P1] e CM11 [P2]) foram positivas para os genes *stx1* e *stx2*, embora apresentassem perfis de virulência distintos. Entre as cepas O22:H16, foram observados os tipos toxigênicos *stx2* (B63/17 [P1] e CM3 [P2]) e *stx1/stx2* (CM14 [P1]) e todas as cepas tinham o mesmo perfil de gene de virulência. As cepas R:H19 apresentaram *stx2* (EC 506 [P1] e M12 [P2]) e *stx1/stx2* (B55/1 [P1] e M17 [P2]) e duas delas possuíam o mesmo perfil de virulência (EC 506 e B55/1) (Tabelas 1 e 2).

Após a identificação dos marcadores de virulência por PCR, foram observados 21 perfis de virulência distintos entre as cepas do grupo P1, onde o perfil 2 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *saa*, *iha*) foi identificado na maioria das cepas, seguido do perfil 1 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *saa*, *iha*, *pilS*) e perfil 12 (*stx2*). Já no grupo P2, foram observados 24 perfis distintos, onde o perfil 16 (*stx1*), em conjunto com os perfis 30 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *iha*) e 35 (*stx2*, *ehxA*, *saa*, *iha*) foram responsáveis por um maior agrupamento de cepas. É possível observar uma grande diversidade nos perfis de virulência observados nos dois períodos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfis de virulência de cepas STEC isoladas nos períodos entre 1989 a 1995 (P1) e

Perfil de	Marcadores de virulência	Cepa
------------------	---------------------------------	-------------

2012 a 2014 (P2)

		P1	P2
1	<i>stx1, stx2, ehxA, saa, iha, pilS</i>	EC21, EC56, GC147, B30/5	M17, CM11
2	<i>stx1, stx2, ehxA, saa, iha</i>	EC23, EC182, EC223, EC861, B16/2	CM4
3	<i>stx1, ehxA</i>	EC139, EC1214	-
4	<i>stx1, stx2, ehxA, saa, iha, pilS, subA</i>	EC233, B55/1 , GC9/38	-
5	<i>stx1, ehxA, saa, iha, pilS</i>	EC 371	-
6	<i>stx1, pilS</i>	EC392	-
7	<i>stx1, ehxA, saa, iha</i>	EC 408	-
8	<i>stx2, ehxA, saa, iha, pilS, subA</i>	EC506, GC20 , GC137	CM19
9	<i>stx2, iha</i>	EC516	CM6
10	<i>stx2, ehxA, saa, iha, subA</i>	EC519	-
11	<i>stx1, stx2, iha</i>	EC531	-
12	<i>stx2</i>	EC546, EC745, EC751, M10	-
13	<i>stx2, ehxA, saa, iha, pilS</i>	EC784 , GC16	-
14	<i>stx1, saa</i>	EC899	-
15	<i>stx1, stx2, saa, pilS</i>	B30	-
16	<i>stx1</i>	B47	M5, M18, M20, CM21, CM23
17	<i>stx2, ehxA, saa, pilS, subA</i>	B84, GC138	-
18	<i>stx2, ehxA, iha, toxB, eae</i>	B1/1d, B18/1d	-
19	<i>stx2, ehxA, iha</i>	B63/17	CM3 , CM15
20	<i>stx1, stx2, ehxA, saa, pilS, subA</i>	GC53/24	-
21	<i>stx2, ehxA, iha, pilS, subA, toxB, eae</i>	GC148c	-
22	<i>stx2, saa, iha, pilS</i>	-	M2
23	<i>stx2, ehxA, saa</i>	-	M4, M9
24	<i>stx2, ehxA, saa, subA</i>	-	M6
25	<i>stx1, stx2, ehxA, saa</i>	-	M11
26	<i>stx2, saa</i>	-	M12
27	<i>stx2, pilS</i>	-	M15
28	<i>stx2, ehxA, iha, pilS, subA</i>	-	M21
29	<i>stx1, iha</i>	-	M24
30	<i>stx1, stx2, ehxA, iha</i>	-	CM1, CM14 , CM16
31	<i>stx1, stx2, saa, iha, subA</i>	-	CM2
32	<i>stx1, ehxA, iha</i>	-	CM5
33	<i>stx2, ehxA</i>	-	CM7
34	<i>stx1, ehxA, saa, iha, pilS, subA</i>	-	CM8
35	<i>stx2, ehxA, saa, iha</i>	-	CM9, CM12, CM13, CM18
36	<i>stx1, stx2, saa, iha, pilS</i>	-	CM17
37	<i>stx2, saa, iha</i>	-	CM20
38	<i>stx2, iha, pilS, eae</i>	-	CM24
39	<i>stx1, stx2, ehxA, iha, pilS, eae</i>	-	CM25

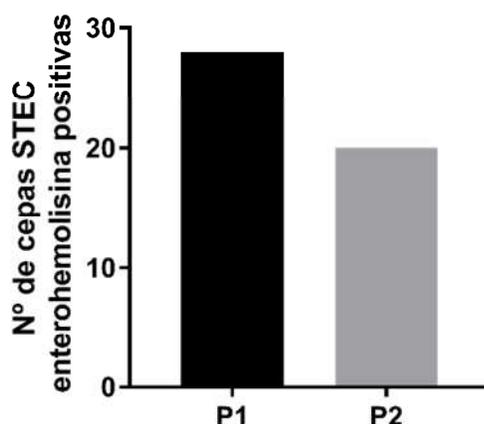
P1 = período de 1989 a 1995; P2 = período de 2012 a 2014. Negrito: cepas utilizadas no ensaio PFGE.

Fonte: O autor, 2020.

4.3 Produção de enterohemolisina

Foi observado que dentre as cepas do grupo P1, 73,7% (28/38) produziram enterohemolisina. Já no grupo P2, este fenótipo foi observado em 54% (20/37) dos isolados (Figura 2). Enquanto houve a expressão de enterohemolisina em todas as cepas do grupo P1 carreando o gene *ehxA*, o mesmo não foi observado em duas cepas *ehxA*⁺ do grupo P2 (Tabela 1 e 2).

Figura 2 - Comparação do fenótipo hemolítico em ágar sangue entre os grupos P1 e P2



Fonte: O autor, 2020.

4.4 Avaliação da produção de biofilme

4.4.1 Teste em Ágar Vermelho Congo

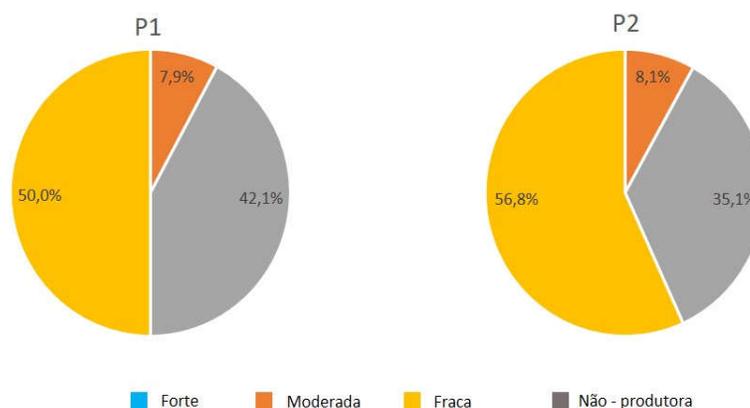
Foi observado que 18,4% (7/38) das cepas STEC do grupo P1 expressaram fenotipicamente fímbria curli, enquanto no grupo P2 este fenótipo foi observado em 67,6% (25/37) das cepas (Tabela 1 e 2).

4.4.2 Teste de adesão em microplacas de poliestireno

O perfil de produção de biofilme entre as cepas dos grupos P1 e P2 foi similar. No grupo P1 a produção de biofilme em placas de poliestireno foi observada em 50% das cepas, sendo 16 (42,1%) classificadas como fracas produtoras de biofilme e três (7,9%) apresentando produção moderada. As demais cepas deste grupo não manifestaram o fenótipo de produção de biofilme. Dentre as cepas STEC do grupo P2 a produção de biofilme foi demonstrada em 43,2% das cepas, sendo 13 (35,1%) fracas produtoras de biofilme e três (8,1%) com produção

moderada (Tabelas 1 e 2). A comparação a respeito da intensidade da produção de biofilme nos dois grupos de amostras STEC se encontra na Figura 3.

Figura 3 - Comparação da produção de biofilme em placas de poliestireno entre cepas STEC isoladas em períodos distintos, P1 e P2



Fonte: O autor, 2020.

4.5 Filotipagem

A filotipagem através do quadruplex PCR revelou que dentre as cepas do grupo P1, 76% (29/38) foram agrupadas no filogrupo B1, enquanto 11% (4/38) estiveram relacionadas ao filogrupo A, 8% (3/38) ao filogrupo D, 3% (1/38) ao filogrupo C e 3% (1/38) ao filogrupo F. Nenhuma cepa P1 esteve relacionada aos filogrupos B2 e (Tabelas 1 e 2).

Em relação ao grupo P2, 65% (24/37) das cepas foram caracterizadas dentro do filogrupo B1, enquanto 11% (4/37) foram agrupadas no filogrupo A, 11% (4/37) ao filogrupo D, 3% (1/37) ao filogrupo B2, 3% (1/37) pertencente à Clade I ou II e 8% (3/37) das cepas P2 não foram atribuídas a nenhum dos filogrupos, sendo classificadas como desconhecidos.

A análise filogenética de todas as cepas mostrou que oito cepas (10,6%) pertencem ao filogrupo A, 53 (70,6%) ao filogrupo B1, uma (1,3%) ao filogrupo B2, uma (1,3%) para o filogrupo C, sete (9,3%) para o filogrupo D e uma (1,3%) ao filogrupo F. O filogrupo E não foi detectado. Uma cepa pertenceu à Clade I ou II e três cepas foram descritas como não tipáveis.

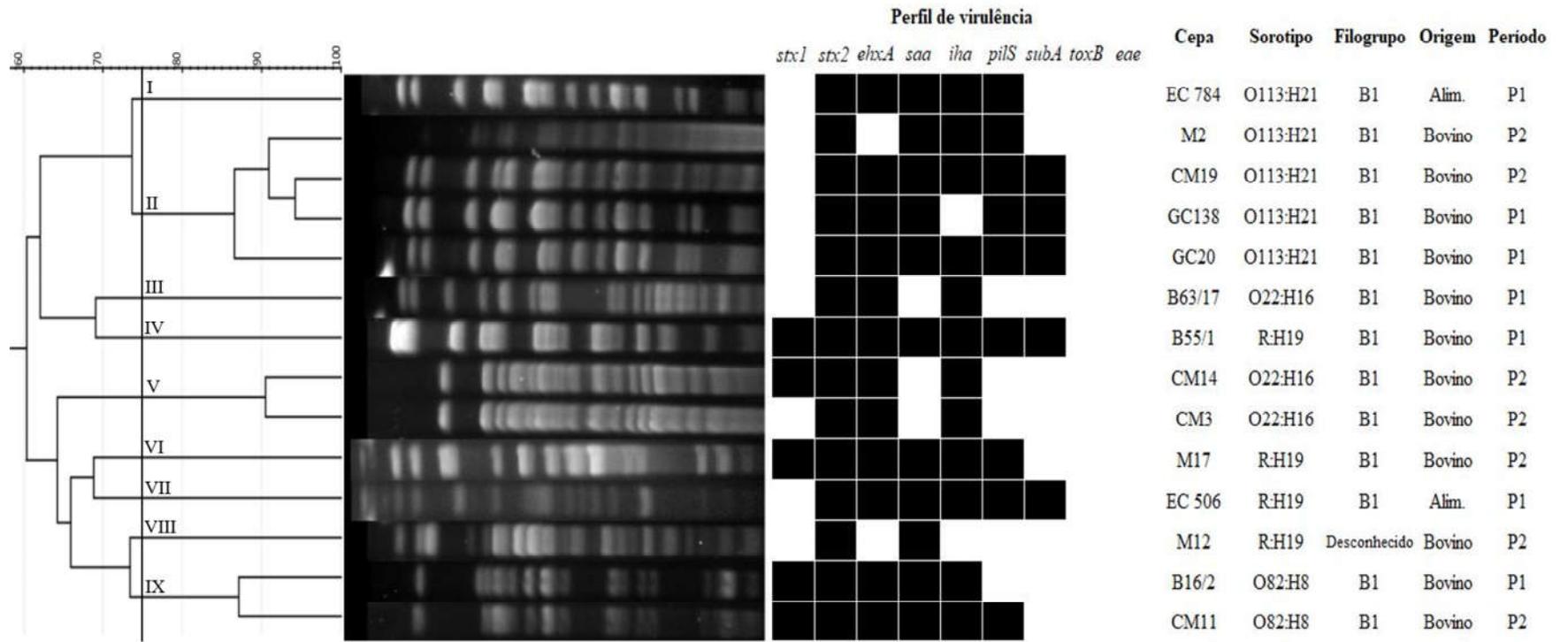
4.6 Avaliação da similaridade genética por PFGE

Os padrões de restrição gerados no ensaio de PFGE, utilizando a enzima de restrição *XbaI*, demonstraram a presença de nove perfis distintos (algarismos romanos de I a IX), com índice de similaridade (IS) mínimo de 75% (Figura 4).

O perfil I, representado apenas pela cepa EC784 de sorotipo O113:H21, apresentou proximidade em relação ao perfil II (M2, CM19, GC138 e GC20), com IS de 74%. As cepas pertencentes ao perfil II (todas de mesmo sorotipo O113:H21) apresentaram IS superior a 86%, indicando presença de grupo clonal composto por cepas STEC antigas e novas.

O perfil V, representado pelas cepas CM14 e CM3, ambas de sorotipo O22:H16, apresentaram um alto IS (90%). No entanto, a cepa B63/17 (perfil III) de mesmo sorotipo, apresentou baixo IS em relação ao perfil V. As cepas B16/2 e CM11, de sorotipo O82:H8, isoladas em períodos distintos, apresentaram IS de 87%. Já as cepas de sorotipo R:H19 apresentaram quatro perfis distintos (IV, VI, VII e VIII).

Figura 4 - Dendrograma PFGE baseado na análise de macrorestrição do DNA genômico com *Xba*I, mostrando as relações entre as cepas STEC agrupadas por sorotipos semelhantes dos grupos P1 e P2



Fonte:

O

autor,

2020.

5 DISCUSSÃO

A ocorrência de STEC é alta em reservatórios animais (principalmente bovinos) e variável em alimentos, sendo mais frequente em produtos cárneos de origem bovina. No Brasil, em relação ao estado do Rio de Janeiro, relatos de baixa ocorrência de STEC em humanos contrastam com a alta ocorrência em animais e alimentos de origem carne (GONZALEZ; CERQUEIRA, 2019). Neste estudo, caracterizamos cepas STEC por meio de técnicas moleculares e testes fenotípicos, a fim de avaliar a virulência e a diversidade genética de cepas com intervalo de isolamento de até 25 anos.

Os dados epidemiológicos mostram que as STEC produtoras de Stx2 são mais comumente relatadas em casos de doenças graves em humanos (RIVAS; CHINEN; GUTH, 2016). Aqui, descrevemos uma prevalência de *stx2* em cepas P2 (51,3% - 19/37), enquanto o perfil de *stx1/stx2* foi prevalente em cepas P1 (42,1% - 16/38). Devido à distribuição mundial do patotipo STEC é possível afirmar que, independentemente da variante *stx*, todas as STEC podem apresentar potencial para causar doenças diarreicas em humanos (OMS, 2018).

Apesar de ter havido, de maneira geral, uma menor taxa de ocorrência dos marcadores genéticos de virulência investigados nas cepas do grupo P2, tais diferenças em relação às cepas do grupo P1 não se mostraram significativas. Além disso, os genes *ehxA*, *saa* e *iha* foram os mais prevalentes em ambos os grupos e foi possível observar a manutenção do perfil de ocorrência relativa destes marcadores (ver Figura 1). Os genes de maior e menor ocorrência mantiveram este comportamento em ambos os períodos estudados, o que demonstra a estabilidade deles ao longo do tempo.

Segundo Boerlim e colaboradores (1999), a presença do gene *ehxA* em cepas STEC *eae+* confere maior virulência (BOERLIM, 1999). Em nosso estudo, o gene *ehxA* esteve presente em quatro das cinco cepas *eae+*, três do grupo P1, além de uma cepa do grupo P2. Em estudos realizados na Espanha e no Japão, na última década, o gene *ehxA* apresentou altas taxas de ocorrência em cepas STEC, 72% e 70%, respectivamente (BLANCO et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2001). Similarmente, no Brasil e na Argentina, *ehxA* foi encontrado, respectivamente, em 77% e 68% de cepas STEC isoladas de bovinos e alimentos cárneos, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho entre as cepas do grupo P1 (73,7%). (GONZALEZ et al., 2016; BRUSA et al., 2013).

Neste estudo, os dados fenotípicos em relação à expressão da enterohemolisina estão de acordo com a identificação do gene *ehxA* por PCR. Dentre todas as 49 cepas de *ehxA+*, 47 (96%) foram capazes de expressar o fenótipo hemolítico. Este resultado que vai de acordo

com o encontrado por Cookson e colaboradores (2007), onde 82,8% das cepas *ehxA*⁺ demonstraram capacidade hemolítica. Por demonstrar relevância epidemiológica, a detecção do gene *ehxA*, em conjunto com a confirmação de seu fenótipo, podem ser usadas como preditores de risco, pois a presença de enterohemolisina está associada a sintomas clínicos graves, como diarreia sanguinolenta e SHU. Além disso, *ehxA*, juntamente com *stx* e *eae*, pode ser usado como um preditor de risco para SHU em infecções por STEC (HUA et al., 2021).

O gene *toxB* foi detectado apenas no grupo P1 em três cepas de sorotipo O157:H7 (B1/1d, B18/1d e GC148). O gene *toxB* está inserido no pO157, e sua presença está associada a cepas STEC *eae*-positivas e ao aumento da secreção de proteínas efetoras pelo T3SS, o que contribui para a expressão do fenótipo de adesão total em cepas de EHEC (TATSUNO et al., 2001). Em estudo realizado na Itália por Badouei e colaboradores (2016), nenhuma das 54 cepas de STEC investigadas carregava este gene. Toma e colaboradores (2004), no Brasil, verificaram a presença de *toxB* em 31,6% (44/139) das cepas STEC, que pertenciam aos sorogrupos O157, O26, O103, O111, O121 e O145. A presença de *toxB* em cepas pertencentes ao *big six* também foi identificada em um estudo no Canadá, onde 50% das cepas STEC foram *toxB*-positivas (WANG et al., 2016). Devido ao envolvimento do gene *toxB* na colonização do intestino do hospedeiro e influência sobre a expressão de proteínas secretadas pelo T3SS, sua detecção, tanto em amostras humanas ou de origem animal, é importante para caracterizar cepas EHEC com um maior potencial de virulência.

A adesina homóloga a IrgA, codificada pelo gene *iha*, é uma proteína responsável por conferir aderência ao epitélio intestinal e, simultaneamente, exerce a função de receptor de sideróforo. Neste trabalho, houve uma maior ocorrência do gene *iha* em relação ao gene *toxB* em ambos os grupos P1 e P2, com taxas de ocorrência de 66,6% e 57,5%, respectivamente. Altas taxas de prevalência do gene *iha* em STEC O157:H7 e não-O157:H7 já foram evidenciadas em estudos realizados no Canadá, Brasil, Japão, apresentando as respectivas taxas de ocorrência: 92%, 79% e 69% (AKIYAMA et al., 2017; GONZALEZ et al., 2016; WANG et al., 2016). A ampla distribuição do gene *iha* entre cepas STEC LEE positivas e LEE negativas é devida ao fato deste gene ser carregado através de EGMs, como plasmídeos e PAIs, como por exemplo, o plasmídeo pO113 (responsável por codificar diversas toxinas e adesinas, como *ehxA*, *saa*, *subA*), LAA (*Locus of Adhesion and Autoaggregation*) e LPA (*Locus of Proteolysis Activity*), respectivamente (COLELLO et al., 2019).

A ocorrência do gene *subA* foi discreta em ambos os grupos, estando presente em apenas 14% das cepas P1 e em 15% das cepas P2, o que pode indicar uma manutenção da

ocorrência deste gene ao longo do tempo. Badouei e colaboradores (2016) e Brusa e colaboradores (2017), relataram taxas mais altas de *subA* em cepas STEC isoladas de bovinos, 54% e 58,8%, respectivamente, o que sugere que a ocorrência deste gene seja variável no reservatório bovino. Já foi demonstrado, através de ensaios de citotoxicidade em células Vero, que a toxina SubA pode ser mais citotóxica que Stx1 ou Stx2 (PATON et al., 2004). Os danos celulares provocados por esta toxina já foram observados (em camundongos), em órgãos como fígado, rim e cérebro (WANG et al., 2007), o que demonstra o potencial de virulência desta toxina.

As cepas STEC que possuem intimina, uma adesina não fimbrial codificada pelo gene *eae*, são classificadas como EHEC e essas cepas são capazes de formar lesão A/E no epitélio intestinal do hospedeiro (CROXEN et al., 2013). Neste trabalho, a identificação de cepas *eae*⁺ foi baixa (6,7%), conforme relatado em outros estudos (ENNIS; MCDOWELL; BOLTON, 2012; IRINO et al., 2005). De acordo com estudos anteriores realizados no Brasil, grande parte das cepas STEC isoladas de animais vinculados à cadeia de produção de alimentos carecem do gene *eae* (Cavalcanti et al., 2020). A relação de exclusividade mútua entre os genes *eae* e *saa* está bem estabelecida na literatura (KINTZ et al., 2019; LEE et al., 2017; PATON et al., 2001; WANG et al., 2018). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram esta hipótese, visto que, todas as cepas *eae*⁺ STEC foram *saa* negativas. Todas as três cepas P1 *eae*⁺, pertencentes ao conhecido sorotipo O157:H7, foram negativas para o gene *saa*, da mesma forma que as cepas P2 *eae*⁺ CM24 (O117:H7) e CM25 (O91:H16) respeitaram este padrão.

Considerando o conjunto dos marcadores de virulência estudados, observou-se a presença de diversos perfis, desde cepas apresentando apenas os genes *stx1* ou *stx2* até cepas apresentando sete dos nove genes investigados. O perfil 1 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *iha*, *pilS*) foi o mais frequente no grupo P1, enquanto no grupo P2 os perfis 16 (*stx1*), 30 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *iha*) e 35 (*stx2*, *ehxA*, *saa*, *iha*) foram os mais descritos. Apesar da diversidade de perfis de virulência encontrados foi possível observar perfis iguais em cepas pertencentes aos dois períodos estudados, destacando-se as cepas de sorotipo O113:H21, GC20 (P1) e CM19 (P2) pertencentes ao perfil 8 (*stx2*, *ehxA*, *saa*, *iha*, *pilS*, *subA*), e as cepas O22:H16, B63/17 (P1) e CM3 (P2) de pertencentes ao perfil 19 (*stx2*, *ehxA*, *iha*).

A expressão de fimbria curli e a formação de biofilme são características fenotípicas variáveis em STEC (BOKRANZ et al., 2005; CHEN et al., 2013). Neste estudo, 35 (87,5%) cepas foram capazes de expressar o fenótipo fimbria curli; no entanto, apenas 30 (75,0%) cepas foram classificadas como formadoras de biofilme no teste de adesão em microplaca de

poliestireno. De acordo com Bokranz e colaboradores (2005), a expressão de fímbria curli não é um pré-requisito para o fenótipo de formação de biofilme. A formação de biofilme em STEC, além de ser variável entre os sorotipos, também apresenta um perfil cepa-específico (DOS SANTOS et al., 2017; WANG et al., 2016). Apesar de a formação de biofilme ser uma característica variável em STEC, é importante destacar o seu papel na persistência e resistência dos patógenos veiculados por alimentos. A matriz exopolissacarídica formada no biofilme é capaz de evitar a penetração de agentes antimicrobianos, bem como dificultar a destruição da estrutura em si, tanto em superfícies bióticas ou abióticas.

Comumente, as cepas intestinais patogênicas de *E. coli* estão relacionadas aos filogrupos A, B1 e, enquanto as cepas pertencentes aos grupos B2 e D estão mais associadas a patógenos extraintestinais (CLERMONT et al., 2011). Em nosso estudo, como esperado em cepas oriundas de bovinos, o filogrupo B1 foi o mais prevalente em ambos os grupos de cepas STEC. Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos, onde o filogrupo B1 esteve mais relacionado a cepas STEC isoladas de bovinos e alimentos (COLELLO et al., 2018; COURA et al., 2019). O filogrupo A, associado a cepas intestinais patogênicas, foi o segundo mais identificado neste estudo (10%). Badouei e colaboradores (2016) encontraram resultados semelhantes em isolados de STEC bovinos, onde o filogrupo B1 foi predominante (61,1%), seguido pelo filogrupo A (22,2%). Após B1, o filogrupo A, geralmente, é o mais associado com STEC isolados de ruminantes (STELLA et al., 2017).

Uma ampla diversidade de sorotipos foi observada. Porém, é importante destacar que alguns sorotipos previamente relatados em doença humana foram detectados em ambos os períodos. As três cepas de sorotipo O157:H7 pertenciam ao grupo P1, por isso, não foram selecionadas para os ensaios de PFGE. No entanto, tais cepas já tiveram sua caracterização realizada (BASTOS et al., 2006).

Dentre as 14 cepas selecionadas para os ensaios de macrorrestrição, nove perfis de PFGE foram observados e identificados por números romanos de I a IX. O perfil I (cepa EC784 de sorotipo O113:H21) foi relacionado ao perfil II, com 74% de IS. As cepas contidas no perfil II tiveram IS próximo a 90%, sendo todas pertencentes ao sorotipo O113:H21, onde a cepa GC20 apresentou um perfil de virulência semelhante à cepa CM19, sugerindo uma relação entre elas apesar da distância temporal do isolamento. A manutenção de alguns clones de STEC no reservatório animal e em seus derivados alimentícios, sugerida para algumas cepas estudadas, também pode se refletir entre cepas humanas. Cavalcanti e colaboradores (2020), ao estudarem 43 cepas STEC brasileiras isoladas em casos de diarreia aguda e/ou

sanguinolenta e SHU entre 2007 e 2017, observaram, por meio de PFGE, altos índices de similaridade (>92%) em cepas com datas de isolamento distintas.

As duas cepas agrupadas no perfil V (cepas CM14 e CM3 inseridas do grupo P2), ambas sorotipo O22:H16, apresentaram um IS superior a 90%, o que sugere a existência de um possível clone, uma vez que ambas as cepas foram isoladas na mesma propriedade rural em diferentes animais. Tal evento já foi demonstrado em outros trabalhos, onde a análise por PFGE revelou uma alta similaridade sorotipo específica (KARAMA et al., 2019; SÁNCHEZ et al., 2010; VAZ et al., 2006). No entanto, a cepa do grupo P1, B63/17, também O22:H16, não foi relacionada ao perfil V, apesar de apresentar um perfil de virulência semelhante (*ehxA* e *iha* positivos). As cepas do perfil IX, B16/2 e CM11 do sorotipo O82:H8 foram isoladas em diferentes períodos e apresentaram IS de 87%. Já as cepas do sorotipo R:H19 apresentaram relação pequena entre si, sendo agrupadas em diferentes perfis de PFGE (IV, VI, VII e VIII). Tal fato pode ser justificado pela diversidade de sorogrupos, o que só seria revelado pela investigação dos genes associados a montagem do antígeno O, uma vez que, por serem rugosas, não se pode identificá-lo pela técnica tradicional de aglutinação.

O conjunto dos resultados obtidos demonstrou, de modo geral, similaridades entre as cepas dos dois grupos estudados. O perfil da ocorrência relativa dos marcadores de virulência investigados foi bastante semelhante. A estabilidade destes genes em cepas STEC recuperadas do reservatório animal e ambiente em um longo período sugere alguma participação ou co-seleção com outros genes que contribuam para a permanência da bactéria nestes locais. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar esta questão.

Foi possível identificar, dentre as cepas, um conjunto mais relacionado entre si, compartilhando sorotipos já descritos em cepas associadas à doença humana e com perfis de PFGE idênticos ou muito relacionados. Esta situação ocorreu não só entre cepas do mesmo grupo, mas entre cepas dos dois grupos, o que indica a estabilidade genética e manutenção das cepas nos animais e ambiente por longos períodos. No tocante a esta manutenção, um estudo mais abrangente do papel da produção de biofilme neste processo, com destaque a comparação entre tais cepas mais relacionadas, ainda resta por ser realizado.

A ampliação da investigação de genes de virulência e a utilização de técnicas mais amplas de caracterização genética, por exemplo, através do sequenciamento completo do genoma, poderá revelar com mais precisão a relação entre tais cepas.

Apesar da baixa ocorrência de casos humanos associados a cepas STEC em nosso estado e no Brasil de modo geral (não se considerando fatores como subnotificação e ocorrência de casos isolados não identificados), a manutenção da circulação de cepas no

reservatório animal com potencial patogênico ao ser humano representa um risco potencial que deve ser periodicamente monitorado. Uma maior compreensão deste potencial patogênico poderá inclusive identificar, cepas/sorotipos de maior virulência e, portanto, alvos preferenciais deste monitoramento.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho, consoante aos objetivos propostos, permitem concluir que as cepas STEC estudadas, de ambos os períodos, apresentam diversidade de marcadores de virulência, porém com ocorrência relativa similar entre cepas isoladas em períodos distintos. A maioria destas cepas demonstra um perfil de virulência compatível à patogenicidade em humanos.

A expressão fenotípica da fimbria curli não apresentou relação direta com a expressão de biofilme, pois o fenótipo de fraca produção de biofilme predominou nos dois grupos estudados. Congruente aos dados da literatura, a produção de biofilme em cepas STEC não é uma característica frequente nem ocorre de modo intenso. A expressão da atividade enterohemolítica na maioria das cepas STEC apresentou correspondência com a identificação do gene *ehxA* por PCR. Devido à relevância do gene *ehxA* na patogenicidade de cepas STEC, sua identificação tem importância na epidemiologia deste patógeno.

Foi observada predominância do filogrupo B1, seguido, em menor proporção, do filogrupo A entre as cepas STEC estudadas. Comumente, cepas oriundas do reservatório animal são agrupadas nestes filogrupos. Dentre a ampla variedade de sorotipos identificados, foi possível destacar um subgrupo de cepas que apresentaram sorotipos previamente associados à doença humana.

A tipificação molecular realizada através do PFGE com cepas isoladas em períodos distintos e com sorotipos semelhantes, demonstrou a presença de perfis PFGE relacionados entre si. Isto permite inferir a provável e grande relação genética entre cepas STEC isoladas em períodos distintos no reservatório bovino.

Portanto, o conjunto dos dados obtidos permite concluir que cepas STEC isoladas no estado do Rio de Janeiro, com potencial patogênico ao ser humano e perfil similar, tem se mantido no reservatório animal (bovinos e alimentos derivados) e no ambiente, por um longo tempo (distância temporal de até 25 anos entre o isolamento das mesmas).

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, Y. *et al.* Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 70, n. 2, p. 181–185, mar. 2017.

AMEZQUITA-LOPEZ, B. A. *et al.* Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 51, n. 4, p. 425–434, ago. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Brasília: Anvisa, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 6 fev. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução – rdc nº 331, de 2 de janeiro de 2001**. Brasília: Anvisa, 2001. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf/view>. Acesso em: 6 fev. 2021.

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

BALDINI, M. M. *et al.* Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 2, n. 3, p. 534–538, 1983.

BANDO, S. Y. *et al.* Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 786–791, set. 2010.

BAST, D. J. *et al.* The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 5, p. 953–960, jun. 1999.

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

BENTANCOR, A B. *et al.* Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in preadolescent schoolchildren in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 5, p. 378–386, 2012.

BEUTIN, L. *et al.* Close association of Verotoxin production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2559–2564, 1989.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Cytotoxic Distending Toxin from Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes Irreversible G2/M Arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 552–562, 2005.

BLANCO, M. *et al.* Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 269–276, 2004.

BOERLIN, P. *et al.* Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 497–503, 1999.

BOKRANZ, W. *et al.* Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1171–1182, 2005.

BRANDAL, L. T. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 324, 2015.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 239–247, 1945.

BRUSA, V. *et al.* Characterization and Molecular Subtyping of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains in Butcher Shops. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 5, p. 253–259, 2017.

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

CAPRIOLI, A. *et al.* Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–12, 2014.

CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. **Manual of tropical medicine**. 3rd ed. New York: William Wood and Co., 1919.

CASTONGUAY, M. H. *et al.* Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 471–478, 2006.

CASTRO, V. S. *et al.* Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* : Pathogenicity, Superspreading, Diagnostic Methods, Occurrence, and Foodborne Outbreaks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 00, n. 6, p. 1–12, 2017.

CASTRO, V. S. *et al.* Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* in Brazil: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 137, 2019.

CAVALCANTI, A. M. F. *et al.* Virulence Profiling and Molecular Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) from Human Sources in Brazil. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, jan. 2020.

CDC. **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>. Acesso em: 16 jan. 2021.

CDC. **PulseNet laboratories transition to whole genome sequencing**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/amd/whats-new/pulsenet-transition.html>. Acesso em: 16 jan. 2021.

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

CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 177–180, 1997.

CHEKABAB, S. M. *et al.* The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 1, p. 1–12, 2013.

CHEN, C.-Y. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming capabilities in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e84863, 2013.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462–3465, 1996.

CLERMONT, O. *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–662, 2011.

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

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, United Kingdom, v. 161, p. 980–988, 2015.

COHEN, M. B. *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **The Journal of pediatrics**, v. 146, n. 1, p. 54–61, jan. 2005.

- COLELLO, R. *et al.* First report of the distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA) pathogenicity island in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Argentina. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, July, p. 259–263, 2018.
- COOKSON, A. L. *et al.* Molecular Subtyping and Genetic Analysis of the Enterohemolysin Gene (*ehxA*) from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Atypical Enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6360–6369, 2007.
- COURA, F. M. *et al.* Virulence factors and phylotyping of *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic water buffalo calves. **Ciência Rural**, v. 49, n. 5, 2019.
- COWAN, S. T. A Review of Names for Coliform Organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 119–124, 1954.
- CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.
- DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. **Animal health research reviews**, v. 12, n. 2, p. 169–185, dez. 2011.
- DIODATI, M. E. *et al.* High genotypic and phenotypic similarity among shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 environmental and outbreak strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 3, p. 235–243, 2015.
- DJORDJEVIC, D. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950–2958, 2002.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, abr. 2002.
- DOS SANTOS, L. F. *et al.* Biofilm formation, invasiveness and colicinogeny in locus of enterocyte and effacement negative O113:H21 Shigatoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 1101–1109, 2017.
- DUDLEY, E. G. *et al.* An IncII Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2102–2114, 2006.
- ENNIS, C.; MCDOWELL, D.; BOLTON, D. J. The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1238–1248, 2012.
- ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. **Reviews of infectious diseases**, v. 10, n. 6, p. 1220–1225, 1988.
- ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 366–72, 2013.

FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.

FLECKENSTEIN, J. M.; KUHLMANN, F. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, n. 3, 2019.

FRASER, M. E. *et al.* Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27511–27517, jun. 2004.

FU, S. *et al.* Genetic diversity of the enterohaemolysin gene (*ehxA*) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

GENTRY, M. K.; J. M. Dalrymple. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 361–366, 1980.

GIRALDI, R., GUTH B. E. C.; TRABULSI L. R. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1460–1462, 1990.

GONZALEZ, A. G. M. *et al.* Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1130–1143, 2016.

GONZALEZ, A.; CERQUEIRA, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the animal reservoir and food in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. DOI:10.1111, out. 2019.

GRAD, Y. H. *et al.* Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 3065–3070, fev. 2012.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 1, p. 12–18, jan. 2006.

HERNANDES, R. T. *et al.* An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137–149, 2009.

HITCHINS, A D. *et al.* *Escherichia coli* and coliform bacteria. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Manual. 7th ed. Arlington, VA, USA: **Association of Official Analytical Chemists**, p. 27–49, 1992.

HUA, Ying *et al.* Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. **Toxins**, v. 71, n. 13, p. 1–11, 2021.

HUGHES, A. C. *et al.* Structural and Functional Characterization of Stx2k, a new subtype of Shiga Toxin 2. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, 2020.

IMAMOVIC, L. *et al.* OI-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4697–4704, 2010.

IRINO, K. *et al.* Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 29–36, 2005.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, 2017.

JOHNSON, J. R. *et al.* The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 965–971, 2005.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, jan. 2000.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 73, n. 4, p. 750–774, dez. 2009.

JOSEPH, B. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–372, 2001.

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

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, mar. 2010.

KARAMA, M. *et al.* Virulence characteristics and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from humans in South Africa: 2006–2013. **Toxins**, v. 11, n. 7, 2019.

KARMALI, M. A. Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) related to changes in the pathogen, the population, and the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 1–22, 2016.

KARMALI, M. A. Factors in the emergence of serious human infections associated with highly pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **International journal of medical microbiology**, v. 308, n. 8, p. 1067–1072, dez. 2018.

KINTZ, E. *et al.* Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Linked to Sprouted Seeds, Salad, and Leafy Greens: A Systematic Review. **Journal of food protection**, v. 82, n. 11, p. 1950–1958, nov. 2019.

KOBAYASHI, H. *et al.* Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 484–489, 2001.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 18, n. 3, p. 775–779, dez. 1977.

LE BOUGUÉNEC, C. Diarrhea-associated diffusely adherent *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, jan. 1999.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS microbiology letters**, v. 256, n. 2, p. 185–194, mar. 2006.

LEE, K. *et al.* Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 8, p. 1557–1566, 2017.

LEE, M.-S.; TESH, V. L. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. **Toxins**, v. 11, n. 4, abr. 2019.

LING, H. *et al.* Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. **Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1777–1788, fev. 1998.

MAPA. **Instrução normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018**. 2018. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/Perguntas-e-respostas-IN_60_2018. Acesso em: 6 fev. 2021.

MARTINEZ-MEDINA, M. *et al.* Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 6, p. 872–882, jun. 2009.

MICHELACCI, V. *et al.* A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 3, 2013.

MIKO, A. *et al.* Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strains from different origins and sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 410–421, 2013.

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

NASH, J. H. E. *et al.* Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 667, 2010.

NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, set. 1987.

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

NEELY, M. N.; FRIEDMAN, D. I. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: Location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1255–1267, 1998.

NEOH, H. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, n. June, p. 103935, 2019.

O’LOUGHLIN, E. V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 6, p. 493–507, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring.** Rome: OMS, 2018.

ORI, E.L. *et al.* Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiol Infect.**, v. 47, n. 10, p. 1-9, 2018.

PALMELA, C. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 67, n. 3, p. 574–587, 2018.

PATON, A. W. *et al.* Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999–7009, 2001.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel Subtilase Cytotoxin. **Journal of Clinical Microbiolog**, v. 43, n. 6, p. 2944–2947, 2005.

PATON, A.; PATON, J. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, *stx* 1, *stx* 2, *eae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PICARD, B. *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 546–553, fev. 1999.

PRAGER, R. *et al.* Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95379, 2014.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10567–10572, set. 2000.

QADRI, F. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 3, p. 465–483, jul. 2005.

QUIÑONES, B. *et al.* O-antigen and Virulence Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by a Rapid and Cost-Effective DNA Microarray Colorimetric Method. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–10, 2012.

RIBOT, E. M. *et al.* Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

RILEY, W. L. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **English Journal of medicine**, v. 308, n. 12, p. 681–685, 1983.

RIVAS, M.; CHINEN, I.; GUTH, B. E. C. Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (ed.). ***Escherichia coli in the Americas***. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 97–123.

RIVERO, M. A. *et al.* Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 345–352, 2010.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews of infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 28–53, 1987.

RUTH WANG, L. Y. *et al.* Multi-year persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a closed canadian beef herd: A cohort study. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–24, 2018.

SAMADDER, P. *et al.* The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. **Environ Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 1815–1826, 2009.

SÁNCHEZ, S. *et al.* Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3–4, p. 445–449, 2010.

SANSONETTI, P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. **Gut**, v. 50, suppl 3, p. 32-8, maio 2002.

SANTOS, A. C. DE M. *et al.* Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2020.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 134–156, jan. 2008.

- VEILLEUX, S.; DUBREUIL, J. D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Veterinary Research**, v. 33, n. 3, p. 239–250, 2005.
- SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 4, p. 622–647, dez. 1992.
- SRIMANOTE, P.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3094–3100, 2002.
- STELLA, A. E. *et al.* PpGpp and cytotoxicity diversity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2204–2211, 2017.
- STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004.
- STEPHENS, T. P.; MCALLISTER, T. A.; STANFORD, K. Perineal swabs reveal effect of super shedders on the transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial feedlots. **Journal of animal science**, v. 87, n. 12, p. 4151–4160, dez. 2009.
- TAIEB, F. *et al.* The Enterobacterial Genotoxins: Cytotoxic Distending Toxin and Colibactin. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, jul. 2016.
- TATARCZAK, M. *et al.* Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1–2, p. 77–85, 2005.
- TATSUNO, I. *et al.* ToxB Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6660–6669, 2001.
- TOMA, C. *et al.* Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4937–4946, 2004.
- TOZZOLI, R. *et al.* Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 178–183, 2010.
- VAN DER WOUDE, M. W.; HENDERSON, I. R. Regulation and function of Ag43 (flu). **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 153–169, 2008.
- VAZ, T. M. I. *et al.* Genetic heterogeneity. **JCM**, v. 44, n. 3, p. 798–804, 2006.
- VAZ, T. M. I. *et al.* Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 903–905, 2004.

WANG, H.; PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathologic Changes in Mice Induced by Subtilase Cytotoxin, a Potent New *Escherichia coli* AB5 Toxin That Targets the Endoplasmic Reticulum. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 7, p. 1093–1101, 2007.

WANG, J. *et al.* Biofilm Formation, Virulence Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of Nine Serogroups of Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 6, p. 316–324, 2016.

WANG, L. *et al.* Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2936–2943, 2003.

WERBER, D.; SCHEUTZ, F. The importance of integrating genetic strain information for managing cases of Shiga toxin-producing *E. coli* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. e264, 2019.

XICOHTENCATL-CORTES, J. *et al.* The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 1, p. 411–421, 2009.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1441–1445, 1996.