

Ylanna Kelner Burgos

Plasmídio pEO5 de *Escherichia coli* do sorogrupo O26:  
Análise comparativa com outros plasmídios que codificam a  
hemolisina em *E. coli* patogênicas

Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências Biológicas.

São Paulo

2009

Ylanna Kelner Burgos

Plasmídio pEO5 de *Escherichia coli* do sorogrupo O26:  
Análise comparativa com outros plasmídios que codificam a  
hemolisina em *E. coli* patogênicas

Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de atuação: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando  
Pestana de Castro

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Burgos, Ylanna Kelner.

Plasmídio pE05 de *Escherichia coli* do sorogrupo 026: análise comparativa com outros plasmídios que codificam a hemolisina em *E. coli* patogênicas / Ylanna Kelner Burgos. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia animal e humana.

Versão do título para o inglês: pE05 plasmid of *Escherichia coli* of 026 serogroup: comparative analysis with other plasmid that encode alpha hemolysin in pathogenic *E. coli*.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. *Escherichia coli* enteropatogenica 3. *Escherichia coli* enterohemorrágica 4. Plasmídeos 5. Hemolisina 6. Proteína de membrana I. Castro, Antonio Fernando Pestana de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós- Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB090/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Ylanna Kelner Burgos.

Título da Tese: Plasmídio pE05 de *Echerichia coli* do sorogrupo 026:  
análise comparativa com outros plasmídios que codificam a  
hemolisina em *E. coli* patogênicas

Orientador(a): Antonio Fernando Pestana de Castro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão  
pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Dedico essa Tese ao meu pai, Antonio Luiz da Costa Burgos,  
Obrigada por ter acreditado em mim.  
Sou eternamente grata a Deus por ter nascido sua filha.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Pestana por ter me aceito no programa de Pós Graduação e por ter permitido que eu pudesse expandir meus horizontes, voando em terras estrangeiras.

Muito obrigada;

Ao Lothar Beutin, pelo apoio no trabalho prático e científico, conselhos e amizade;

A equipe do BfR, em especial Karin Pries, Angelika Miko, Sabine Habby, Katja Stegel pelos ensinamentos, amizade e companherismo ao longo de um ano.

A Professora Kinue Irino pelas correções realizadas na qualificação e tese. Principalmente pelas críticas construtivas, paciência e portas abertas;

Aos Professores Roxane Piazza, Marcelo Brocchi, Tania A. Tardelli Gomes do Amaral, Rosa Maria Silva pelas sugestões e correções da minha qualificação;

A Cláudia de Oliveira Ayala, pela amizade e pelo apoio incondicional. Você é parte integral dessa tese e da minha vida;

Ao meu irmão Maurício Kelner Burgos, por tudo, e a minhas Famílias: Burgos, Kelner Harrison e Neumann que são parte de mim e estímulo da minha vida;

A CAPES pelo suporte financeiro na Alemanha e a FAPESP pelo apoio financeiro no Brasil; Fazer ciência sem o apoio desses Órgãos de Fomento seria impossível.

A Alice por ter me ajudado ao longo desses 5 anos com conselhos técnicos e pessoais, serei sempre grata;

A equipe da secretaria do ICBII, Ana e Naíde por ter ajudado sempre em tudo que eu precisei;

A equipe da Biblioteca, em especial Maria José J. Carvalho e a Senhora Eva pelo auxílio e agilidade;

A todos que de uma forma direta ou indireta me ajudaram a chegar aqui. Escrever essa Tese foi mais fácil do que tentar listar nomes sem ser injusta. Meu eterno obrigada.

## RESUMO

BURGOS, Y.K., **Plasmídio pEO5 de *Escherichia coli* do sorogrupo O26: Análise comparativa com outros plasmídios que codificam a hemolisina em *E. coli* patogênicas.** 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O plasmídio pEO5, que codifica a  $\alpha$  hemolisina, foi isolado de uma amostra humana de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) do sorotipo O26 e comparado com o plasmídio pO157 de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) do sorotipo O157 que codifica a enterohemolisina. Este plasmídio mostrou ser conjugativo, compatível com o plasmídio pO157, e através de testes de hibridização observou-se que estes plasmídios não são geneticamente relacionados. Para o estudo comparativo de similaridade foi sequenciada uma região de 9227 pb de DNA do pEO5 que compreende todo o operon composto por quatro genes *hlyCABD* e suas regiões a montante e a jusante. A região determinante do operon (7225 pb) e a região promotora do operon, *hlyR*, foram similares às mesmas regiões do plasmídio pHly152 que codifica uma  $\alpha$  hemolisina oriundo de uma amostra de *E. coli* isolada de roedor (99,2% e 98,8% respectivamente). No entanto, verificou-se a presença de elementos de inserção (IS2) na região a montante do gene *hlyC* no plasmídio pHly152. O plasmídio pEO5 mostrou ser semelhante a outros plasmídios que também codificam a  $\alpha$  hemolisina em cepas de EPEC O26 de origem humana e de bovinos. A presença de estruturas semelhantes a transposons em ambas as extremidades do operon  $\alpha$  *hlyCABD* do pEO5 indica que esse fator de virulência provavelmente foi adquirido por transferência horizontal de genes.

**Palavras-Chave:**  $\alpha$  hemolisina. Enterohemolisina. *Escherichia coli*. EPEC atípica. EHEC. Sorogrupo O26.

## ABSTRACT

BURGOS, Y.K., **pEO5 Plasmid of *Escherichia coli* of O26 serogroup: comparative analysis with other plasmids that encode alpha hemolysin in pathogenic *E. coli*.** 2009. 65 P. Thesis (PhD Thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The conjugative plasmid pEO5 encoding alpha-haemolysin in strains of human enteropathogenic of *Escherichia coli* (EPEC) O26 was investigated for its relationship with enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) haemolysin-encoding plasmids of EHEC O26 and O157 strains. Plasmid pEO5 was found to be compatible with EHEC virulence plasmids and did not hybridize in Southern blots with plasmid pO157 from the EHEC O157:H7 strain EDL933, indicating that both plasmids were unrelated. A 9227 bp stretch pEO5 DNA encompassing the entire operon *tat* encodes four genes *hlyCABD* was sequenced and compared for similarity to plasmid and chromosomally inherited alpha-hly determinants. The alpha *hly* determinant of pEO5 (7252 bp) and its upstream region was most similar to corresponding sequences of the murine *E. coli*  $\alpha$  *hly* plasmid pHly152, in particular, the structural  $\alpha$ -*hlyCABD* genes (99.2% identity) and the regulatory *hlyR* regions (98.8% identity). pEO5 and  $\alpha$  *hly* plasmids of EPEC O26 strains from humans and cattle were very similar for the regions encompassing the structural  $\alpha$ -*hlyCABD* genes. The major difference found between the *hly* regions of pHly152 and pEO5 is caused by the insertion of an IS2 element upstream of the *hlyC* gene in pHly152. The presence of transposonlike structures at both ends of the  $\alpha$  *hly* sequence indicates that pEO5 virulence factor was probably acquired by horizontal gene transfer.

**Keywords:**  $\alpha$  hemolysin. Enterohemolysin. *Escherichia coli*. atypical EPEC. EHEC. O26 serogroup.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1-** Determinação do perfil plasmidial de amostras do sorogrupo O26 através de S1-PFGE. gel de agarose a 1% **36**
- FIGURA 2-** Determinação do tamanho do plasmídio linear que codifica alfa hemolisina e enterohemolisina por hibridização do PFGE com sondas marcadas com digoxigenina específicas  $\alpha$ -hly e E-hly (a) DNA bacteriano tratado com nuclease S1 e separado por PFGE. **37**
- FIGURA 3-** Perfil de restrição por endonucleases dos plasmídios pEO5 e pO157 e hibridizações por *southern blot* (a) Gel de agarose a 0.7% com DNA dos plasmídios pEO5 e pO157 de *E. coli* em uma corrida eletroforética e digerido por diferentes enzimas de restrição (b e c) hibridização com sonda  $\alpha$ hly e Ehly respectivamente. **38**
- FIGURA 4-** Diferentes tamanhos de plasmídios que codificam alfa hemolisina isolados de diferentes amostras e cepas de *E. coli*. (A) Extração plasmidial pelo método de Kado e Liu (1978), em gel a 0.7% em eletroforese horizontal e (B) a hibridização. **39**
- FIGURA 5-** Determinação do tamanho do plasmídio linear que codifica alfa hemolisina por hibridização do PFGE com sonda marcadas com digoxigenina específicas  $\alpha$ -hly. A esquerda: DNA bacteriano tratado com nuclease S1 e separado por PFGE. **39**
- FIGURA 6-** Corrida eletroforética com DNA plasmidial tratado com diferentes enzimas de restrição. (A) Gel de agarose a 0,7% com DNA plasmidial recombinante de *E. coli* (B) hibridização por *Southern blot* com sonda  $\alpha$ HlyCABD. **40**
- FIGURA 7-** Mapa genético da região determinante e regiões adjacentes do pHly152 (GenBank M14107 e X07565) e do pEO5 (GenBank FM180012). **41**
- FIGURA 8-** Gel de eletroforese a 1% mostrando os três diferentes tamanhos de amplicons obtidos com iniciadores 32 f+r. **44**
- FIGURA 9-** Gel de agarose a 2% com perfil de restrição obtido com a enzima *apa*LI com os três tamanhos de amplicons encontrados com os iniciadores 32 f+r **44**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Amostras utilizadas neste estudo	23
<b>TABELA 2-</b> Amostras recombinantes	24
<b>TABELA 3.</b> Lista de iniciadores desenhados a partir do pEO5 para este estudo	27
<b>TABELA 4-</b> Iniciadores específicos para amplificação de genes <i>hlyCABD</i> cujo operon encontra-se em plasmídios ou cromossomo	30
<b>TABELA 5-</b> Principais resultados encontrados nas amostras	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1 Amostras</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Métodos</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1 Caracterização fenotípica das amostras</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2 caracterização genotípica</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3 Determinação da localização do operon que codifica alfa e enterohemolisina</b>	<b>28</b>
<b>3.2.4 Caracterização dos plasmídios</b>	<b>31</b>
<b>3.2.4.1 Determinação do tamanho dos plasmídios</b>	<b>31</b>
<b>3.2.4.2 Classificação dos plasmídios</b>	<b>31</b>
<b>3.2.5 Determinação da similaridade genética do plasmídio pEO5 em relação a outros plasmídios que codificam alfa e enterohemolisina</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5.1 Determinação da similaridade genética entre o pEO5 e pO157</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5.2 Determinação da similaridade genética entre pEO5 e outros plasmídios alfa hemolíticos</b>	<b>33</b>
<b>3.2.5.3 Determinação da similaridade genética entre o pEO5 e pHly152</b>	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Caracterização das amostras de <i>E. coli</i> do sorogrupo O26 de origem humana e animal quanto à presença dos genes associados à produção de alfa hemolisina e enterohemolisina</b>	<b>35</b>

<b>4.2 Determinação do perfil do operon que codifica alfa hemolisina nas amostras de <i>E. coli</i> do sorogrupo O26 analisadas</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Verificação da capacidade dos plasmídios, que codificam alfa hemolisina, de promover conjugação</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Observação do perfil de compatibilidade e similaridade do plasmidio pEO5 e pO157</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Comparação do perfil pEO5 com o perfil de outros plasmídios que codificam alfa hemolisina localizados em outros patótipos de <i>E. coli</i>.</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Determinação da similaridade genética do plasmídio pEO5 em relação a outras amostras que possuam o operon que codifica alfa hemolisina</b>	<b>40</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Escherichia coli* é um bacilo pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. São Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose (TRABULSI *et al.*, 2004). *E. coli* e outras bactérias comensais da microbiota bacteriana frequentemente formam uma relação benéfica de simbiose com o hospedeiro, provendo nutrientes chave para o desenvolvimento, (YAN e POLK, 2004), sintetizando co-fatores e contribuindo na colonização contra organismos patogênicos (DONNENBERG, 2002). Por ser encontrada em fezes de humanos e animais é considerada um indicador de contaminação fecal (LEVINE, 1987; LOW *et al.*, 1988).

A diferença entre a habilidade de algumas amostras de *E. coli* causarem doenças e diversas síndromes causadas por diferentes sorotipos pode ser atribuída a existência de genes específicos que codificam fatores de virulência e a capacidade de transferência genética da *E. coli* (DONNENBERG, 2002). Atualmente, são reconhecidos os seguintes patótipos de *E. coli*: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) típicas e atípicas (EPECa), *E. coli* Enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* Enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* produtora da Toxina de Shiga (STEC), sendo a *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) considerada um subtipo de STEC, *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Necrotoxigênica (NTEC) e *E. coli* Uropatogênicas (UPEC). As cepas desses grupos apresentam mecanismos de patogenicidade específicos, sorotipos distintos e podem causar infecções e síndromes diferentes (MAINIL, 1999). Alguns autores separam as *E. coli* de acordo com o local da infecção em intestinais e extra-intestinais, responsáveis por infecções diversas fora do intestino como cistite e meningites (LLOYD *et al.*, 2007).

Amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 são descritas como agentes causadores de diarreias em crianças desde 1951 (ORSKOV, 1951). Este sorogrupo também já foi isolado de amostras de STEC bovinas (LEOMIL *et al.*, 2005), e é comumente encontrado em infecções humanas (SZALO *et al.*, 2004). Este sorogrupo é encontrado em amostras dos patótipos de EPEC e EHEC (SCOTLAND *et al.*, 1990)

Jenkins *et al.* (2007), observaram, analisando dados clínicos de pacientes com SHU, que existem diferenças, baseadas em modelos matemáticos, na incidência de VTEC O26 dependendo da localização geográfica. No Japão, entre as amostras não-

O157 isoladas, este é o sorogrupo mais encontrado, correspondendo a 18% do total das amostras de *E. coli* estudadas no período entre 1997 a 1999 (HIRAMATSU *et al.*, 2002). A presença de amostras do sorogrupo O26 em casos de Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) tem aumentado na Áustria, Alemanha (GERBER *et al.*, 2002) e Itália (TOZZI *et al.*, 2003). Caprioli *et al.* (1997) descreveram o aumento deste sorotipo também na Inglaterra. Essas amostras têm sido descritas na Irlanda, como causadoras de doenças severas em humanos (NEELY *et al.*, 2004). Na Escócia, esse foi o sorogrupo mais encontrado em bezerras e o segundo mais isolado em águas de represa (PEARCE *et al.*, 2004). Na Espanha (BLANCO *et al.*, 2004), Finlândia (KESKIMAKI *et al.*, 1998), Polônia (PACIOREK, 2002), Brasil (GUTH *et al.*, 2002) e Bélgica (SCHRIJVER *et al.*, 2008), amostras do sorogrupo O26 foram isoladas de crianças.

A presença do gene *stx* é característica do patótipo de amostras STEC, mas não é o único responsável pela patogenicidade neste grupo (BIELASZESWSKA *et al.*, 2007). Um aumento na quantidade de fatores de virulência foi confirmado neste patótipo por Caprioli *et al.* (2005). Zhang *et al.* (2000) observaram no perfil plasmidial de *E. coli* uma notável heterogeneidade a respeito do tamanho e combinações de genes, encontrando 20 diferentes padrões plasmidiais entre 55 amostras de STEC O26 isoladas. Análises das características cromossômicas e plasmidiais elucidaram que esse sorogrupo é amplo e que novos subgrupos clonais patogênicos podem emergir em curtos intervalos. Ainda neste estudo, foi observado que a extensiva variedade de plasmídios em amostras do mesmo sorotipo é provavelmente devido à transferência horizontal desses elementos móveis, resultando na mudança do DNA bacteriano.

Segundo pesquisa realizada por Bielaszewska *et al.* (2007), os padrões obtidos através de PFGE com amostras do sorogrupo O26 de EHEC e EPEC atípica apresentam-se similares. Ainda segundo este estudo uma perda do gene *stx*<sub>2</sub> nas amostras de EHEC O26 foi detectada em 10 a 14% das colônias testadas, passando para o patótipo de EPEC atípica, os autores sugerem que esse processo pode ocorrer no intestino de humanos, com implicações clínicas, epidemiológicas e evolucionárias. Essa conversão de patótipo pode ocorrer de forma bidirecional, por ser um bacteriófago, e explicaria o fato de EHEC e EPEC atípica do sorogrupo O26 de

diferentes amostras terem um genoma semelhante uma alta conservação dos genes *house keeping*.

Análises filogenéticas sugerem que o ganho e a perda de elementos móveis de virulência têm ocorrido frequentemente em diferentes linhagens de *E. coli* patogênicas (MORABITO *et al.*, 2003) e pode ser explicado devido à mobilidade de elementos genéticos como os bacteriófagos, Ilhas de Patogenicidade (PAI) e plasmídios. Segundo Wagner (2006) essa transposição de informações genéticas acontecem através de sequencias de inserção (ISs), que são pequenas sequencias de DNA. Entre os ISs encontram-se o (s) gene (s) de interesse, chamado de gene (s) selecionado (s). Segundo Siguier *et al.* (2006), mais de 1500 diferentes ISs já foram identificados, proporcionando um efeito amplo na construção e remodelamento do genoma bacteriano.

A Família de toxinas bacterianas *Repeat in Toxin* (RTX) partilham o sistema de secreção de exoproteína do tipo I presente em uma variedade de bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pasteurella hemolytica*, *Morganella morganii*, *Actinobacillus pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholera* (WELCH, 2001) e *Proteus vulgaris* (CZUPRYNSKI e WELCH, 1995). A atividade citotóxica dessa Família difere entre espécies bacterianas. Cada uma tem uma especificidade por hospedeiro e mecanismos de ação diferentes (WELCH, 2001).

RTX são divididas em duas categorias: as Hemolisinas, que possuem capacidade de lesar uma variedade de tipos celulares e as Leucotoxinas que são célula- e espécie-específicas. Apesar de divergirem em vários aspectos essas toxinas dividem o mesmo padrão de organização: um operon constituído de quatro genes com uma ordem de transcrição similar *rtxCABD*. A produção dessa toxina requer uma modificação da proteína RTXA pós-tradução para tornar-se uma toxina biologicamente ativa (LALLY *et al.*, 1999).

Nas hemolisinas, HlyA é sintetizado como um polipeptídeo inativo e convertido na forma ativa pela adição de um grupo de ácido graxo catalisado pela proteína HlyC. A secreção de  $\alpha$ -hemolisina é mediada por um sistema de translocação de membrana mediado pelas proteínas HlyB e HlyD (SCHMIDT *et al.*, 1995). HlyB é um membro de uma superfamília *ATP-Binding Proteins* e é responsável pela primeira energia requerida

para o processo de transporte. A HlyD é uma proteína acessória ou adaptadora da membrana interna e da proteína de membrana externa. Aliada a essas proteínas secretoras, participa uma proteína de membrana externa homóloga a TolC (ANDERSEN *et al.*, 2000).

A atividade de virulência dos genes que codificam a hemolisina provavelmente é multifatorial e inclui a liberação de íons de ferro contidos em eritrócito e toxicidade direta para tecidos hospedeiros humanos que tenham uma *E. coli* com esse operon *hlyCABD* (WELINDER-OLSSON e KAIJSER, 2005). Essa citolisina é ativa em diferentes células como: linfócitos, granulócitos, eritrócitos e células tubulares renais. Sendo as hemolisinas responsáveis por efeitos citotóxicos em eritrócitos, leucócitos, fibroblastos, nefrotoxigenicidade e ainda indução na produção de histamina (GRÜNIG *et al.*, 1987).

Em testes de hibridização DNA-DNA, Felmlee *et al.* (1985), sugerem que em senso evolucionário, os genes que codificam hemolisina integraram o DNA das *E. coli* recentemente, mas sua distribuição é ampla nesta espécie. As hemolisinas já descritas em *E. coli* apresentam dois perfis fenotípicos em agar sangue: alfa-hemolítico ( $\alpha$ Hly) e Enterohemolítico (Ehly) (WELCH, 2001). A produção de enterohemolisina é codificada por plasmídio (SCHMIDT *et al.*, 1994) e a produção de  $\alpha$  hemolisina pode ser codificada por plasmídios ou pelo cromossomo bacteriano (CAVALIERE *et al.*, 1984; HACKER e HUGHES, 1985; BAILEY *et al.*, 1992).

O perfil fenotípico da  $\alpha$ -hemolisina expressa em placas de agar sangue produz um halo de hemólise grande e translúcido ao redor da colônia bacteriana e a formação deste halo pode ser observada após poucas horas de incubação (KERÉNYL *et al.*, 2005). Já a Enterohemolisina apresenta um halo de hemólise menor e turbido ao redor da colônia e necessita mais tempo de incubação para ser observada (SCHMIDT *et al.*, 1995).

Alfa hemolisina pode ser codificada por diferentes plasmídios em *E. coli*. (BEUTIN *et al.*, 1991) e apesar de apresentarem um perfil heterogêneo em tamanho, grupos de incompatibilidade e formas de conjugação todos partilham uma ampla homologia genética. A  $\alpha$ -hemolisina codificada no cromossomo normalmente encontrada em *E. coli* isolada de pacientes com infecção urinária e é a melhor caracterizada na literatura (SCHMIDT *et al.*, 1995).



Prada *et al.* (1991) avaliaram 24 amostras de *E. coli* produtoras de hemolisina isoladas de cães com gastroenterite. Destas, oito carregavam o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina em plasmídios e 16 carregavam o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina no cromossomo. Essas diferenças não foram visíveis pelo seu perfil fenotípico e sim através da técnica de hibridização de membrana por *Southern blot*, utilizando sondas específicas.

Em amostras cujo operon que codifica  $\alpha$  hemolisina encontra-se localizado em plasmídios, os genes *hlyCABD* são transcritos por uma região promotora a montante (*upstream*) do gene *hlyC*. Os genes são altamente conservados mas a região a montante tem divergências significantes. Este operon está comumente cercado por sequências de inserção (BAILEY *et al.*, 1992). Hemolisinas cujo operon localiza-se no cromossomo ou extra cromossomal mostram alta homologia entre os genes estruturais quando visualizados na hibridização. Porém análises de restrição com endonucleases indicam diferenças na seqüência entre os dois tipos de genes *hlyCABD* (HESS *et al.*, 1986).

Em um estudo realizado com 42 amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 isoladas de humanos, 16 produziram o fenótipo enterohemolítico (Ehly) (BEUTIN *et al.*, 1988). Estudos posteriores mostraram que a enterohemolisina é codificada por um plasmídio de virulência (pO157) de 90 kb, (SCHMIDT *et al.*, 1994). O gene *ehxa* é considerado o melhor marcador presente no plasmídio pO157 e também pode ser detectado em outras amostras de STEC não-O157 (BRASHEARS *et al.*, 2003). O operon da enterohemolisina possui 60% de homologia com o operon *hlyCABD* de  $\alpha$ -hemolisina (WELINDER-OLSSON e KAIJSER, 2005). Essa hemolisina é comumente encontrada em STEC e sua alta freqüência tem sido amplamente investigada (CAPRIOLI *et al.*, 2005). Além do gene *ehxa* o pO157 possui outros genes como *katP* (catalase-peroxidase), *espP* (serine-protease) e *toxB* (toxina B- nome recebido por possuir 20% de similaridade com a toxina B de *Clostridium difficile*), que estaria envolvido na colonização bacteriana no intestino (TOZOLLI *et al.*, 2005).

Ehly e  $\alpha$ -hly diferem entre si genética, fenotípica e imunologicamente (DONNENBERG, 2002). Leomil *et al.* (2005), empregando técnicas de PFGE e MLST, observaram que dentro do sorogrupo O26 existiam dois grupos clonais distintos: o

primeiro formado apenas por amostras de EPEC O26,  $\alpha$  hemolíticas, fermentadoras de Ramnose e Dulcitol (RDF), e o outro grupo formado por amostras EPEC e EHEC, enterohemolíticas, não fermentadoras de Ramnose e Dulcitol. Esse trabalho enfatiza a existência de diferenças genéticas e fenotípicas dentro do mesmo sorogrupo, porém não explica o porquê desta divisão de linhagem clonal.

Segundo Bailey *et al.* (1992), amostras de *E. coli* que possuem o operon que codifica alfa hemolisina, isoladas de infecções intestinais de animais, carregam os genes para síntese e secreção da toxina ativa em um plasmídio grande e transmissível, enquanto que amostras de *E. coli* que possuem o operon alfa hemolítico isoladas do trato urinário de humanos carregam os mesmos genes no cromossomo. No entanto, dados anteriores a esse descrevem a presença de amostras de *E. coli* com o fenótipo alfa-hemolítico isoladas de fezes de humanos codificadas por plasmídios (DE LA CRUZ *et al.*, 1980; GRÜNIG e LEBEK, 1988). Beutin *et al.* (1986), realizaram um estudo com 147 amostras isoladas de fezes de humanos pertencentes a 11 sorogrupos diferentes de EPEC e observaram uma alta frequência do gene *ahlyA* no sorogrupo O26, localizado em um plasmídio conjugativo de  $100 \pm 5$  MDa, chamado pEO5. Essa foi a primeira descrição sobre esse plasmídio, onde foi analisada a diferença de tamanho, compatibilidade e expressão da hemolisina em relação a outras hemolisinas codificadas por genes localizados em plasmídios.

A evolução de cada plasmídio tem seu próprio histórico. Estes parecem resistir a uma remodelagem interna, assim como a transferência horizontal. Em alguns casos estes plasmídios podem trocar fatores de virulência ou integrar-se ao genoma, transformando-se em uma Ilha de Patogenicidade (PAI) (DONNENBERG, 2002). Ilhas de Patogenicidade são distintos tipos de elementos genéticos maiores que 10 kb, com a presença de genes associados à virulência. Há também frequente associação com tRNA codificadores de genes para bacteriófagos temperados e um conteúdo de Citosina e Guanina diferente do resto do cromossomo. Esses elementos são frequentemente cercados por estruturas repetidas e carregam muitos fragmentos e outros elementos móveis (DOBRINDT *et al.*, 2002).

Amostras de *E. coli* que possuem o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizado em Ilhas de Patogenicidade são freqüentemente isoladas de infecções urinárias.

Apesar deste operon encontrado em amostras de UPEC, como as amostras isoladas de pacientes com pielonefrite, J96 (Número de acesso no GenBank M10133), 536 (Número de acesso no GenBank CP000247) e CFT073, oriunda de um paciente com urosepticemia (Número de acesso no GenBank AE014175.1) já terem sido seqüenciado, autores como Dobrindt *et al.* (2002) embora acreditem na possível aquisição de grandes regiões de DNA, como PAIs, por transferência horizontal, acham que ainda existem lacunas sobre a evolução.

Em recente estudo Lloyd *et al.* (2007), utilizando pesquisas de Hibridização Genômica Comparativa (CGH), identificaram 2,820 genes comuns a todas as UPEC, amostras fecais e comensais já seqüenciadas. Eles estimaram que 131 genes encontravam-se associados apenas em amostras UPEC disponíveis no banco de dados e em nenhuma das amostras comensais e fecais examinadas. A metade desses genes são descritos como hipotéticos ou com poucos relatos na literatura de sua caracterização funcional.

Análises dos sequenciamentos realizados das Ilhas de Patogenicidade da amostra 536 (PAI I<sub>536</sub>-PAI V<sub>536</sub>) revelaram que a PAI I<sub>536</sub> (Número de acesso no GenBank AJ488511) e PAI II<sub>536</sub> (Número de acesso no GenBank AJ494981) albergam, entre outros genes, operons completos que codificam alfa hemolisina (DOBRINDT *et al.*, 2002). A amostra isolada de uma bacteriúria assintomática ABU83972 possui os dois operons sendo um deles não funcional (WILES *et al.*, 2008), enquanto que amostra CFT073 (PAI II<sub>CFT073</sub>) (BRZUSZKIEWICZ *et al.*, 2006) possui apenas um operon que codifica a alfa hemolisina. Ainda Segundo Brzuszkiewicz *et al.* (2006), a maioria dessas PAIs podem ser associadas a uma possível ascendência da infecção pelo trato urinário (UTI) e que a aquisição de dois fatores *hly* determinantes pode ser responsável pela alta virulência *in vivo* da amostra 536 (pielonefrite) em comparação a amostra CFT073 (urosepticemia). Marrs *et al.* (2005), relataram que aproximadamente 50% das amostras UPEC isoladas possuem *ahly* e que a expressão desse gene está associada ao aumento de casos clínicos de pacientes com UTI. Lloyd *et al.* (2007), revelaram que existe uma correlação de 75% entre o gene *ahly* com outros fatores de virulência como *cnf1* e fimbrias do tipo 1 e P.

Enquanto estudos sobre esse operon que codifica alfa hemolisina localizado no cromossomo em amostras UPEC são mais frequentemente realizados, poucos grupos destinam suas pesquisas para o operon que codifica alfa hemolisina localizado em plasmídios. Apenas uma amostra cujo operon alfa hemolítico encontra-se no plasmídio pHly152, isolada das fezes de um roedor (HESS *et al.*, 1986), havia sido sequenciada (Número de acesso no GenBank M14107) (VOGEL *et al.*, 1988) sendo a única seqüência disponível para estudos de similaridade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Análise comparativa do plasmídio que codifica a alfa hemolisina (pEO5) de *Escherichia coli* do sorogrupo O26 com outros plasmídios que codificam a alfa hemolisina e a enterohemolisina em *E. coli* enteropatogênicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 de origem humana e animal quanto à presença dos genes associados à produção de alfa hemolisina ( $\alpha$ Hly ) e Enterohemolisina (Ehly);
- Determinar o perfil plasmidial das amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 que possuem o operon que codifica a alfa hemolisina;
- Verificar se os plasmídios que codificam alfa hemolisina possuem a capacidade de promover conjugação;
- Observar o perfil de compatibilidade e similaridade do plasmidio pEO5 e pO157;
- Comparar o pEO5 com outros plasmídios que codificam a alfa hemolisina em outros patótipos de *E. coli*;
- Determinar a similaridade genética do plasmídio pEO5 em relação a outros plasmídios que contem o operon que codifica a hemolisina.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Amostras

**Amostras de *E. coli* do sorogrupo O26.** Foram estudadas amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 para análise comparativa do plasmídio que codifica alfa hemolisina e o plasmídio que codifica a enterohemolisina. As amostras utilizadas no presente trabalho pertencem à coleção do Dr. Lothar Beutin (National Reference *E. coli*, Berlim, Alemanha) e do Professor Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (Laboratório de Bacteriologia médica e Veterinária, ICB II, USP) e estão relacionadas na Tabela 1.

**Amostras de outros patótipos.** Com o intuito de comparar o perfil plasmidial e melhor caracterização do operon que codifica a alfa hemolisina foram acrescentadas nesta pesquisa: amostras de ETEC caninas anteriormente estudadas (PRADA *et al.*, 1991) com o operon *ahlyCABD* inserido em plasmídios de diferentes tamanhos; amostras suínas classificadas como ETEC e STEC, com operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizado em plasmídio e amostras de sorotipos diferentes com o operon que codifica alfa hemolisina localizado no cromossomo (PRADA *et al.*, 1991; PRADA *et al.*, 1992). Estas amostras também encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1- Amostras utilizadas neste estudo.

Amostras	Sorotipo	Origem	Patótipo <sup>c</sup>	País <sup>a,b</sup>
C 4115	O26:H-	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
CB 1027	O26:NM	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	BR, 1981
CB 1030	O26:NM	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	BR, 1981
CB 9866	O26:NM	Bovino	EPEC ( <i>ahly</i> )	BR, 2003 (LEOMIL <i>et al.</i> , 2005)
IP 187	O26:NM	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	F (BEUTIN <i>et al.</i> , 1988)
1108/83	O26:H-	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
C 4066	O26:H-	Humano	EPEC (-hly)	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
CB 5805	O26:H	Humano	STEC ( <i>ahly</i> )	S, 1996
CB 7389	O26:H-	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	F, 1997
CB 7391	O26:H-	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	F, 1997
CB 6953	O26:H-	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	USA, 1997
C 4040	O26	Humano	EPEC (-hly)	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
C 4060	O26	Humano	EPEC (-hly)	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
698/83	O26:H32	Humano	EPEC (-hly)	A, 1983
1040/83	O26:H11	Humano	EPEC ( <i>ehxa</i> )	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1988)
CB 7117	O26:H <sup>+</sup>	Humano	STEC ( <i>ehxa</i> )	F, 1997
C 4170	O78:H <sup>-</sup>	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1985 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1988)
U4-41	O4:k3:H5	Humano	UPEC ( <i>ahly</i> )	DK, 1941
Goe 644 (536)	O6:K15:H31	Humano	UPEC ( <i>ahly</i> - PAI II)	A, 1983 (DOBRINDT <i>et al.</i> , 2002)
Goe 575 (536)	O6:K15:H31	Humano	UPEC ( <i>ahly</i> - PAI I e PAI II)	A, 1983 (DOBRINDT <i>et al.</i> , 2002)
84/2S	O75:H2	Canino	ETEC ( <i>ahly</i> )	A, (PRADA <i>et al.</i> , 1991)
84/3208	O42:H37	Canino	ETEC ( <i>ahly</i> )	A, (PRADA <i>et al.</i> , 1991)
84/2195	ONT:H10	Canino	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, (PRADA <i>et al.</i> , 1991)
84/R	O121: H46	Canino	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, (PRADA <i>et al.</i> , 1991)
84/2573	O70:H-	Canino	ETEC ( <i>ahly</i> )	A, (PRADA <i>et al.</i> , 1991)
CB853	O138:NM	Suíno	STEC ( <i>ahly</i> )	A, 1989
CB855	Or:NM	Suíno	STEC ( <i>ahly</i> )	A, 1989
CB857	O157:NM	Suíno	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1989
CB860	O149	Suíno	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1989
573/83	O25:K7:H1	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
540/83	O114:H9	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1980 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
695/83	O126:H27	Humano	EPEC ( <i>ahly</i> )	A, 1983 (BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)

a) Origem (A: Alemanha; Br: Brasil; DK: Dinamarca; F: França; USA: Estados Unidos da América; S: Suíça; Ano de isolamento; b) Referência Bibliográfica ou ano de isolamento. c) amostras caracterizadas e/ou testes fenotípicos testados na época da publicação ou isolamento e confirmados pela presença de genes por PCR não confirmado se são amostras de EPEC atípica.

**Amostras controles e recombinantes.** Amostras utilizadas como controle positivo e negativo para a técnica de PCR e comparação de suas sequências disponíveis no Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foram cedidas por Felmlee *et al.* (1985), Hess *et al.* (1986). A amostra K12 (JC3272) e o vetor pACYC184 foram utilizados para a construção dos clones de pEO5. As amostras recombinantes construídas por conjugação ou transformação encontram-se dispostas na Tabela 2.

Para verificação da coexistência dos operons que codificam alfa e enterohemolisina inseridos em plasmídios encontrados nas amostras O26 estudadas, transferimos o pEO5 (157 kb) para a amostra 1040/83, portadora do plasmídio de virulência pO157 de 97 kb, carreando os genes *ehxa*, *katP* e *espP*. Esta amostra transconjugante chamada de TPE497, estabilizou os dois plasmídios e foi positiva para os genes *ahly* e *ehxa* após conjugação através da PCR. O fenótipo dominante expresso em agar sangue foi alfa hemolítico (TABELA 2). A amostra TPE2611 foi construída através da conjugação das amostras já recombinadas TPE422 e TPE1313 também com o intuito de observar a coexistência e estabilidade desses dois operons na mesma amostra.

**TABELA 2-** Amostras recombinantes.

Amostras	Número de acesso no Genbank <sup>a</sup>	Informações relevantes <sup>b</sup>	Origem <sup>c</sup>
TPE422	FM180012	pEO5 - C4115 em <i>E. coli</i> JC3272 ( $\alpha$ Hly, lac-, strepR)	(BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
TPE1313	AF074613	pO157 - C600 pO157::tn801(Ehly, lac-, strepR, ampR)	((SCHMIDT <i>et al.</i> ,1994)
TPE497	-	$\alpha$ Hly pEO5 + EHly pO157	Este estudo
TPE477	-	pEO5::Tn5 em JC3272 (pEO5::Tn5, kanaR, strepR)	(BEUTIN <i>et al.</i> , 1986)
374	X07565 e M1410	pHly152 ( $\alpha$ Hly)	(HESS <i>et al.</i> , 1986)
WAF100	M10133	pSF4000 ( $\alpha$ Hly)	(WELCH <i>et al.</i> , 1983)
TPE2318	-	pSF400 (pACYC184) em C600 ( $\alpha$ Hly, cloranR)	Este estudo
TPE2319	FM180012	pEO5(pACYC184) em C600 ( $\alpha$ Hly, strepR, cloranR)	Este estudo
TPE2320	FM180012	pEO5(pACYC184) em C600 ( $\alpha$ Hly, strepR, cloranR)	Este estudo
TPE2321	-	pACYC184 (-Hly, cloranR)	Este estudo
TPE2611	-	TPE422 + TPE1313 em JC3272	Este estudo

a)Número de acesso no (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); b)Padrão exibido pelas amostras semeadas em placas ágar sangue em até 24h/37 °C: ( $\alpha$ Hly) alfa hemolisina; (Ehly) enterohemolisina; (-Hly) ausência de hemólise; Padrão lac-: observado em placa de endo ágar em até 24h/37 °C; LEGENDA: strepR= estreptomicina resistente, ampR= ampicilina resistente, cloranR= cloranfenicol resistente, kanaR= kanamicina resistente c) Referências



## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Caracterização fenotípica das amostras

Para a verificação da expressão das hemolisinas as amostras foram semeadas em placas de agar Triptose (Difco), suplementado com 10 mM CaCl<sub>2</sub> e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, de acordo com a metodologia descrita por Beutin *et al.* (1986). As placas foram incubadas a 37 °C e suas áreas de hemólise foram examinadas após 3h ( $\alpha$ Hly) e após incubação por 18h (Ehly).

### 3.2.2 Caracterização genotípica

Para a caracterização e confirmação do genótipo das amostras, utilizamos a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase ( *Polymerase Chain Reaction*-PCR). Os iniciadores utilizados para o gene *ahlyA*: [hlyAF16 - 5'- CAG TCC TCA TTA CCC AGC AAC - 3'; hlyAB14 - 5' - ACA GAC CCC TTG TCC TGA AC - 3'], com um amplicon de 355 pb (BEUTIN *et al.*, 2004). Para o gene *ehxA* foram utilizados os iniciadores: [ehlyA1 - 5'- GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTAG - 3'; ehlyA4 - 5'- TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A - 3'], produzindo um amplicon de 1551 pb (SCHMDIT *et al.*, 1995). Estes iniciadores foram testados em todas as amostras independente do perfil fenotípico apresentado em agar sangue.

As concentrações dos reagentes utilizados na PCR foram: 35,5  $\mu$ l de água pura estéril; 5  $\mu$ l de tampão 10 x NH<sub>4</sub>; 1,5  $\mu$ l de tampão MgCl<sub>2</sub>; 0,4  $\mu$ l de Taq DNA polimerase (Bioline), acrescidos de 5  $\mu$ l de DNA; 1  $\mu$ l da mistura de dNTP (0,2 mM de cada base); 1  $\mu$ l dos iniciadores em um volume final de 50  $\mu$ l e submetidas ao termociclador (94 °C - 30 segundos, Temperatura de anelamento - 30 segundos, 72 °C - 1 minuto x 30 ciclos e extensão final 72 °C - 5 minutos).

Ao final de cada ciclo uma alíquota de 5  $\mu$ l do produto amplificado e 3  $\mu$ l de tampão de corrida eletroforética Azul de Bromotimol foram aplicados em um gel de agarose a 1% e submetidos a separação eletroforética a 50 Volts em tampão de corrida

TBE (0,009 M ácido bórico - 0,09 M Tris - 0,025 M EDTA, pH 8.2), juntamente com os marcadores de peso molecular de 10000 pb HyperLadder I (Bioline). O gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/ml) e a sua leitura foi procedida em um transiluminador para observação do tamanho fragmento amplificado.

Iniciadores desenhados neste estudo através do plasmídeo pEO5 foram testados em todas as amostras e encontram-se na Tabela 3.

**TABELA 3.** Lista de iniciadores desenhados a partir do pEO5 para este estudo.

Designação	Região	sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Temperatura de anelamento	Fragmento
EO5-1f	A montante e parcial hlyC	GTA GTT CAA AAG ACA ACTCGTG	50,6 °C	676 pb
EO5-1r		ATC CCC GAA AGG AGC AAT C		
EO5-3f	hlyC / hlyA	GGG CAT GTA TCC TGG CTA TG	52,6 °C	640 pb
EO5-3r		AGT CTG TTT CCC GCA TTG C		
EO5-4f	hlyC / hlyA	AGA GAT TCT TGGGCA TGTATCC	52,6 °C	599 pb
EO5-4r		TTC GTG CTT TGT CCT GCT G		
EO5-6f	hlyC interno	GTA TCA TGC CCA AAC CAG AC	52,6 °C	549 pb
EO5-8f	hlyC interno	GGA ATA ACA GAG AGC TTC GTG	52,6 °C	599 pb
EO5 6-8r	hlyC interno	GCA AGT TTT TAT TGC GCT GAC		
EO5-9f	hlyC/hlyA	GCA CAA ATT AAA AGCACA CTGC	53,1 °C	667 pb
EO5-9r		ACT TAT TAC CAA CA CGT TCAG		
EO5-10f	hlyC/hlyA	GCT GCA AAT AAA TTG CACTC G	53,1 °C	666 pb
EO5-10r		CCC TGC ACC GAT ATT ATC AAG		
EO5-15f	hlyC/hlyA	GTTTAGTAATCGCCGTGCC	57 °C	550 pb
EO515r		GGACTTCAGGTGATCGTAAATG'		
EO5-16f	hlyA	CCAGTCTTCTGCAACTAATGAG	57°C	452 pb
EO516r		TGTCGTACAAAGAACAGGAATG		
EO5-17f	hlyA interno	GCGGGCATCATATCCATTTTC	57 °C	695 pb
EO5-17r		CCAATACAAAGCACCTGAACG		
EO5-20f	hlyA interno	TTCTGAGATGGCAGAAGCG	56,5 °C	400 pb
EO5-20r		CAATTAACCGGCAGCAGC		
EO5-21f	hlyA	GGCTTCAAAGCAGGCAATG	56,5 °C	604 pb
EO5-21r		AATACGAATTTCCCGATACTGG		
EO5-25f	hlyA	TCAAGGGTGTGATAAATGGAC	56,5 °C	635 pb
EO5-25r		CTTATCGTTACCATCACCGC		
EO5-26f	hlyA	CACACTGAGTGGTGGAAAC	56,5 °C	687 pb
EO5-26r		TCTTTAACATCGAAGCTACCTG		
EO5-30f	hlyA	GAACTTATTGGGACCACGC	56,5 °C	601 pb
EO530r		TCACCTGACTCTTTTTCAAACC		
EO5-31f	hlyA para hlyB	AATTACCTGAACGGCGGAG	56,5 °C	608 pb
EO5-31r		TCTTTAACATCGAAGCTACCTG		
EO5-32f	hlyR para hlyC	GTCTTGCCGTACAATAATTTCC	56,5 °C	671 pb
EO5-32r		TCCGTTAATGTCATAACTCGC		
EO5-33f	transposase próxima hlyR	TGTCGAAGGTCATGTAATCG	56,3°C	689 pb
EO5-33r		CCGGAAACTACCCGTAAC		
EO5-35f	interno Hly R	GCTATCGCGTTTAGGTTATCC	57°C	400 pb
EO5-35r		ATCACACTTCGTCAAATTCAG		
EO5-36f	HlyC para HlyB	TGGTTTGAAAAAGAGTCAGGTG	56,6°C	744 pb
EO5-36r		CAGACTGTTCGAGAACACG		
EO5-41f	HlyB	CATTAGTCTGGAGAGAGGATGG	52,6 °C	603 pb
EO5-41r		CCAAAACAGATGTTAATGCCTG		

continua

Tabela 3 (Continuação)

Designação	Região	sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Temperatura de anelamento	Fragmento <sup>a</sup>
EO5-44f	Interno ao HlyR	ATTCCAAGCGAAGTCCATCCCC	53,7 °C	680 pb
EO5-44r		CATAAAGCATGATGCCACCACG		
EO5-48r	hlyB	GGAAGTCAGGGTGATCTTAATC	52,2 °C	601 pb
EO5-48f		TGATATAACGCCTCAAACCTCAG		
EO5-49r	hlyB	GCATTAGTCTGGAGAGAGGATG	52,5 °C	683 pb
EO5-49f		AGCGAAAATAAGATCACCCAGAG		
EO5-50r	hlyB	GTTGCGAGGGTAAGAGAATTAG	53,4 °C	604 pb
EO5-50f		CAGTTGGAGAGTTAAGCACATC		
EO5-51r	hlyB	ACAAATCTGGCAGGATTTCC	53,5 °C	623 pb
EO5-51f		GAGCACTGGTTGCTTCATC		
EO5-54f	hlyB	TTGATGGACATGATCTTGCG	53,6 °C	637 pb
EO5-54r		CGGATTTTCCATGTTTCACTCC		
EO5-55f	hlyB	AGTTCCTGTTGCGCTATAAAC	52,6 °C	635 pb
EO5-55r		GGCAAGTACTGTTAATCGCTC		
EO5-56f	HlyB / hlyD	AAGAGGAAGTACTGCGTTTAAC	52,3 °C	629 pb
EO5-56r		CACTTTAATGATGGCATTCTGC		
EO5-57f	hlyD	AAGAGCGTCAACAGGCTTC'	54 °C	642 pb
EO5-57r		TCGGTAGCTTTTCCTAGCAC		
EO5-58f	A jusante hlyD 5200-5800 pb	CATTAGTCTGGAGAGAGGATGG	52,5 °C	601 pb
EO5-58r		TCTCTTACCCTCGCAACAG		
EO5-59f	A jusante hlyD 5600-6100 pb	TTTTGCACATAGTACAAGTCGG	53,4 °C	683 pb
EO5-59r		GCTCCCAACCATAGGTTGATG		

(a) fragmento obtido após a corrida eletroforética em um gel de agarose 1%, pb = pares de base

(conclusão)

### 3.2.3 Determinação da localização do operon que codifica alfa e enterohemolisina Isolamento de DNA cromossômico e plasmidial

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o *kit Isolation of DNA from Bacteria Pellets* (Invitex) a partir de 5 ml de uma cultura em Caldo Triptona de Soja (Tryptic Soy Broth-TSB, Difco) incubada por 18h a 37 °C. A confirmação da localização do operon que codifica alfa hemolisina localizado no cromossomo foi realizada pela PCR utilizando os iniciadores específicos indicados na Tabela 4.

Para a obtenção do DNA plasmidial dois procedimentos diferentes foram adotados: plasmídios de tamanhos superior a 70 Kb foram purificados utilizando o *Large-construct kit* (Qiagen); para plasmídios com até 70 Kb a purificação foi realizada

com o *spin Miniprep kit* (Qiagen). Esse DNA isolado foi utilizado para testes de PCR-RFLP, construção de amostras recombinantes e sequenciamento.

Todas as amostras cujo operon que codifica alfa hemolisina estivesse localizado em plasmídio foram submetidas também à extração pelo método de Kado e Liu (1981), para visualização dos plasmídios transferência para as membranas e posterior hibridização com as sondas.

Todos os plasmídios foram obtidos a partir de uma cultura inicial de mesmo volume relatado na etapa de isolamento do DNA. Após a purificação uma alíquota de 5  $\mu$ l de DNA e 3  $\mu$ l de tampão de corrida eletroforética Azul de Bromotimol foram aplicados em um gel de agarose a 0,7% e submetidos a separação eletroforética a 50 Volts em tampão de corrida TBE (0,009 M de ácido bórico - 0,09 M de Tris - 0,025 M de EDTA, com pH 8.2), por aproximadamente 4h, juntamente com os marcadores de peso molecular de 10000 pb HyperLadder I (Bioline) e 23130 pb DIG II (Roche). O gel foi corado com brometo de etídio (10  $\mu$ g/ml) e a sua leitura foi procedida em um transiluminador.

**Transferência e hibridização de membrana.** Para identificação dos plasmídios que contêm o operon que codifica a  $\alpha$ -hemolisina através da técnica de Kado e Liu (1981), procedeu-se a transferência por *Southern Blotting* e a membrana foi hibridizada com uma sonda específica construída através do produto amplificado utilizando os iniciadores EO5 1f/1r que amplifica a região do gene *hlyC* e parte da região a montante ao operon.

As sondas para diferenciação de plasmídio contendo operon que codifica alfa e enterohemolisina foram desenvolvidas utilizando produtos de PCR com os iniciadores  $\alpha$ Hly e Ehly descritos no item 3.2.2.

A Hibridização do DNA plasmidial coma sonda genética marcada com Digoxigenin-11- dUTP foi realizada conforme descrito por SCHMIDT *et al.* (1994). Marcadores moleculares de sonda (DIG Roche) foram utilizados para determinação dos fragmentos de DNA hibridizados.

**Desenvolvimento de iniciadores específicos.** Iniciadores para amplificação da região localizada diretamente a montante ao operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizado no cromossomo foram desenvolvidos utilizando sequências depositadas no GenBank já caracterizadas. Os iniciadores localizados na PAI I (81f + 81r) e na PAI II (72f + 72r) da amostra uropatogênica 536 (DOBRINDT *et al.*, 2002) foram desenvolvidos utilizando o programa *Accelrys Gene*. Iniciadores para amplificação do gene *hlyA* (EO10f + EO10r) serviram como controle positivo para detecção de amostras  $\alpha$ HlyA cujo operon localiza-se tanto em plasmídeo como no cromossomo. O iniciador 1f/1r amplifica apenas nas amostras que possuem o operon que codifica alfa hemolisina localizado em plasmídeo. Os iniciadores utilizados, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento amplificado obtido encontram-se na Tabela 4.

**TABELA 4-** Iniciadores específicos para amplificação de genes *hlyCABD* cujo operon encontra-se em plasmídios ou cromossomo

Região	Número de acesso	Iniciadores	sequência de nucleotídeos (5'-3')	Ta (°C) <sup>a</sup>	Fragmento (pb) <sup>b</sup>
<i>hlyA</i> (1915-1936) (2560-2580)	FM180012	EO-10f EO-10r	GCTGCAAATAAATTGCACTCAG CCCTGCACCGATATTATCAAG	53.1	666
pEO5 a montante <i>HlyC</i> (953-974) (1612-1630)	FM180012	EO-1f EO-1r	GTAGTTCAAAGACAACCTCGTG ATCCCCGAAAGGAGCAATC	50.6	678
pEO5 entre HlyR+ região "pHly" (597-618) (1246-1267)	FM180012	EO-32f EO-32r	GTCTTGCCGTACAATAATTTCC TCCGTTTAATGTCATAACTCGC	56.5	671
pEO5 interno ao <i>hlyR</i> (167-188) (830-851)	FM180012	EO-44f EO-44r	ATTCCAAGCGAAGTCCATCCCC CATAAAGCATGATGCCACCACG	66.5	685
<i>E. coli</i> PAI I (536) a montante de <i>HlyC</i> (44506-45278) e 47 b em <i>HlyC</i>	AJ488511	81f 81r	CCTGTGACACTTCTCTTGC CCCAAGAACCTCTAATGGATTG	52.3	773
<i>E. coli</i> PAI II (536) a montante de <i>hlyC</i> (31974-32668) e 177 pb em <i>HlyC</i>	AJ494981	72f 72r	CCCAACTACAATATGCAACAGG CGCCAATAGAGTTGCCTTC	51.9	695

a)Ta-Temperatura de Anelamento; b) fragmento obtido após a corrida eletroforética em um gel de agarose 1%, pb = pares de base

### 3.2.4 Caracterização dos plasmídios

#### 3.2.4.1 Determinação do tamanho dos plasmídios

O tamanho exato dos plasmídios foi determinado pela técnica de Nuclease S1-Pulsed *Field Gel Electrophoresis* (S1-PFGE) seguindo a metodologia descrita por Barton *et al.* (1995). A enzima nuclease S1 foi utilizada seguindo recomendações do fabricante (Amersham). Para a corrida no campo pulsado foi utilizado o sistema de campo eletrônico homogêneo (CHEF-DR II system) com tempos de pulsos variando entre 2 e 30 segundos por 18,5h a 210 Volts, utilizando o tampão de corrida (0,5 x TBE/10 °C).

Depois da corrida o gel foi corado com brometo de etídio para visualização dos plasmídios. Os marcadores moleculares: *lambda ladder* PFGE marker (Biolabs) e *low range* PFGE marker (Biolabs), auxiliaram na observação do tamanho do plasmídio linear confirmado com auxílio do programa Photo-captMw 10.01.

A sonda para detecção da sequência de DNA contendo o operon que codifica a  $\alpha$ -hemolisina utilizada para hibridização das membranas obtidas através de S1-PFGE foi construída utilizando o iniciador EO5-4f /4r capaz de amplificar a região dos genes *hlyC* e *hlyA*.

Para a confirmação da presença do plasmídio que codifica alfa e enterohemolisina, foi realizada a transferência por *Southern Blotting* e as membranas foram hibridizadas com as sondas *ahly* e *EhlyA* marcada com Digoxigenin-11- dUTP, conforme descrito por Schmidt *et al.* (1994).

#### 3.2.4.2 Classificação dos plasmídios

As amostras foram testadas quanto à capacidade de conjugação. A amostra receptora utilizada foi o padrão K12-JC3272, que é estreptomicina resistente (BEUTIN *et al.*, 1986). As amostras que possuíam o fenótipo alfa hemolítico quando semeada em agar sangue por 24h a 37 °C, foram chamadas de potenciais doadoras. Uma colônia

isolada de cada amostra (doadora e receptora) foi transferida para 5 ml de TSB e mantida sob agitação por 12h a 37 °C.

Após crescimento alíquotas de 1 ml da amostra doadora e 1 ml da amostra receptora foram transferidas para um tubo contendo 3 ml de TSB e incubado a 37 °C/18h. As possíveis colônias conjugantes foram selecionadas em placas contendo agar sangue acrescido de antibióticos nas seguintes concentrações finais: Ampicilina 10 µg/ml, Kanamicina 30 µg/ml, estreptomicina (200 µg/ml) e Tetraciclina 10 µg/ml, dependendo da resistência das amostras chamadas doadoras. Dados referentes a resistência a antibióticos das amostras chamadas doadoras encontram-se na Tabela 5.

A transferência dos genes foi confirmada através da observação do crescimento das colônias em placas de agar sangue, Endo agar e LB agar com e sem antibióticos. A confirmação genética foi realizada pela PCR com os iniciadores utilizados para detecção da alfa e enterohemolisina descritos no item 3.2.2.

### **3.2.5 Determinação da similaridade genética do plasmídeo pEO5 em relação a outros plasmídios que codificam alfa e enterohemolisina**

#### **3.2.5.1 Determinação da similaridade genética entre o pEO5 e pO157**

O DNA plasmidial das amostras TPE1313 e TPE422 foi extraído segundo o item 3.2.3 e digerido com enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen), *Apall* (Biolabs) e *HindIII* (Invitrogen). Após a digestão, eletroforese e transferência, conforme descrito no item 3.2.3, as membranas foram hibridizadas com a sonda mista de fragmentos de restrição *Apall*, *EcoRI* e *HindIII* (DIG-marcado) construídos individualmente para os respectivos plasmídios.



### 3.2.5.2 Determinação da similaridade genética entre pEO5 e outros plasmídios alfa hemolíticos

Todas as amostras com os genes do operon *dhly* localizado nos plasmídios foram submetidas a técnica de PCR com os iniciadores relacionados na Tabela 3. Pares de iniciadores específicos para amostras cujo operon alfa hemolítico foram estrategicamente desenhados com auxílio do programa *Accelrys Gene*, utilizando a sequência do GenBank FM 180012. Os produtos da PCR foram tratados com a enzima de restrição *HinfI* (Invitrogen) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%.

### 3.2.5.3 Determinação da similaridade genética entre o pEO5 e pHly152

**Clonagem.** O DNA plasmidial da amostra TPE422, que carrega o plasmídio pEO5, (BEUTIN *et al.*, 1986) foi isolado (conforme item 3.2.3) e digerido com a enzima de restrição *Sall* (Biolabs) que mantém a integridade do operon alfa *hlyCABD* (FELMLEE *et al.*, 1985; HESS *et al.*, 1986). Após a digestão, o DNA contido no pEO5 foi ligado, utilizando a ligase T4 (Roche) com o vetor plasmidial pACYC184, também previamente digerido com *Sall* (Biolabs), e transformado em uma amostra não hemolítica K-12 JC3272 (SCHMIDT *et al.*, 1994). O transformantes que expressavam a  $\alpha$  hemolisina foram selecionados em placas de agar sangue suplementado com 20  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol.

O DNA plasmidial contendo o operon que codifica a  $\alpha$  hemolisina das amostras recombinantes TPE2319 e TPE2320 foi isolado (conforme item 3.2.3) digerido com as enzimas de restrição *HincII* (Biolabs), *EcoRI* (Invitrogen) e *Sall* (Biolabs), submetido à eletroforese por 4h, transferido para as membranas e hibridizadas com sonda construída com o fragmento *Aval-A* oriundo do plasmídio pSF4000. O fragmento *Aval-A* de pSF4000 cobre uma área superior a 90% da área determinante do operon que codifica a  $\alpha$  hemolisina do clone pSF4000 (WELCH *et al.*, 1983; PRADA *et al.*, 1991). O tamanho do DNA inserido foi determinado através da soma dos fragmentos do vetor pACYC184 (4245 pb) e dos fragmentos obtidos pela digestão, e confirmado com auxílio do programa Photo-captMw 10.01.

**Sequenciamento.** A análise da sequência de nucleotídeos dos clones construídos que possuem operon que codifica alfa hemolisina, pEO2319 e pEO2320, foi realizada através de PCR. Iniciadores localizados no sítio de restrição *Sall* do vetor pACYC184 foram desenhados com auxílio do programa *Accelrys Gene* versão 2.5, a partir da sequência disponível no GenBank (Número de acesso no GenBank X06403). Produtos de PCR foram amplificados, purificados e utilizados para sequenciamento utilizando o *dye terminator chemistry* (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) e separados com o seqüenciador automático de DNA (ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 *Genetic Analyzer*, Applied Biosystems, Foster City, CA). A análise do DNA do plasmídio pEO5 inserido nos plasmídios recombinantes pEO2319 e pEO2320 foi realizada por sequência de fita simples (*single strand*) e *primer walking* e foi submetido a um seqüenciamento da dupla fita (*double strand*) com cobertura de  $\geq 6$  voltas. As sequências foram analisadas utilizando os programas *Lasergene* (DNASTAR, Madison, WI) e *Accelrys Gene 2.5*. Um fragmento de 9227 pb foi obtido através do sequenciamento dos plasmídios pEO5, pEO2319 e pEO2320 que abrange a região do operon  $\alpha$ *HlyCABD* e regiões adjacentes (Número de acesso no GenBank FM 180012).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 de origem humana e animal quanto à presença dos genes associados à produção de alfa hemolisina e enterohemolisina

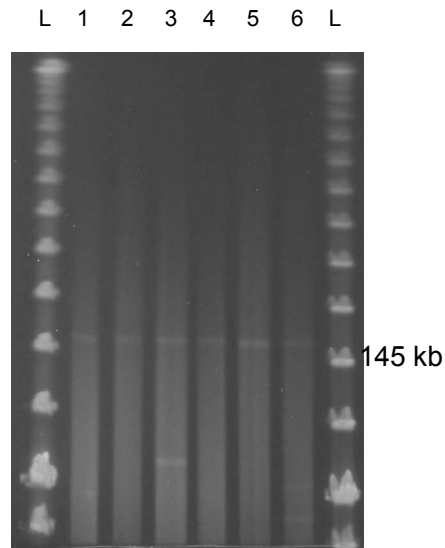
Entre as 16 amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 estudadas (TABELA 1), onze possuíam os genes associados a produção de alfa hemolisina localizados em plasmídio, observado através de teste de PCR com iniciadores específicos, bem como suas características fenotípicas, expressas em agar sangue. Este padrão de expressão de  $\alpha$  hemolisina das amostras estudadas foi selecionado para comparação do operon *ahlyCABD* codificado pelo pEO5 com outras amostras O26.

A amostra CB5805 possui o operon *ahlyCABD* e é positiva também para o gene *stx<sub>2</sub>*. As amostras 1040/83 e CB7117 possuíam os genes associados à produção de enterohemolisina.

A caracterização das amostras foi realizada pela técnica de PCR, utilizando iniciadores indicados no item 3.2.2 e os principais resultados encontram-se na Tabela 5. Todas as amostras foram testadas independente do padrão de expressão da hemolisina em placas contendo agar sangue.

### 4.2 Determinação do perfil do operon que codifica alfa hemolisina nas amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 analisadas

Selecionamos cinco amostras isoladas de humanos (C4115, CB1027, CB1030, IP187) e bovino (CB9866) para investigação do operon que codifica hemolisina em amostras de EPEC O26 localizado em plasmídio. Todas as amostras carregavam o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina em plasmídios de tamanho similar ao pEO5 estimado com auxílio do programa Photo-captMw 10.01 em 157 kb (FIGURA 1).



**FIGURA 1-** Determinação do perfil plasmidial de amostras do sorogrupo O26 através de S1-PFGE. gel de agarose a 1% LEGENDA: (L) marcador de peso molecular para PFGE (Biolabs), (1) TPE422, (2) C4115,(3) CB9866, (4) CB1027, (5) CB1030, (6) IP187.

### 4.3 Verificação da capacidade dos plasmídios, que codificam alfa hemolisina, em promover conjugação

Todas as 24 amostras que continham o operon *ahlyCABD* localizados em plasmídios foram testados para averiguação da capacidade de transferência de informações por conjugação.

Verificou-se que os plasmídios pEO13 (84/R) e pEO14 (84/2S) isolados de amostras caninas e o pEO860 (CB860) da amostra suína foram os únicos que não transferiram o operon para a amostra receptora.

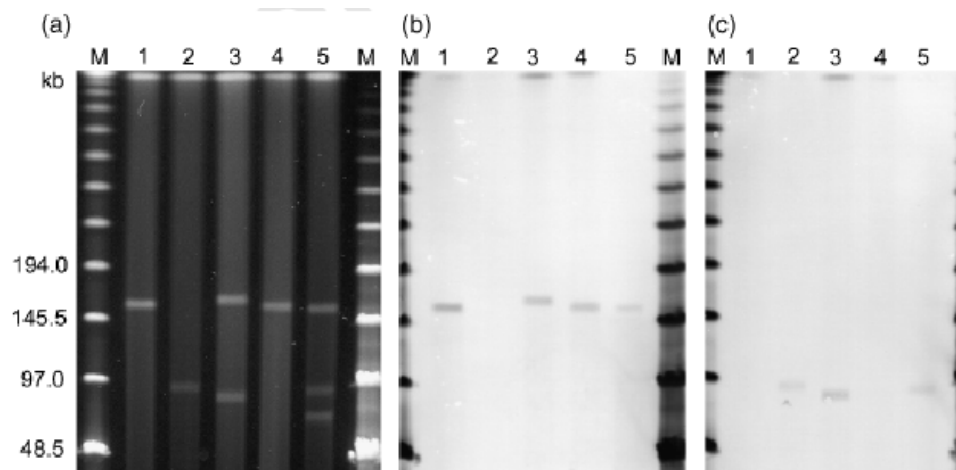
As amostras que possuíam os genes que codificam a enterohemolisina não transferiram o operon para a amostra receptora.

### 4.4 Observação do perfil de compatibilidade e similaridade do plasmídio pEO5 e pO157

As amostras recombinantes foram construídas, aonde o plasmídio pEO5 foi introduzido em amostras que já continham o plasmídio pO157, para observação de uma

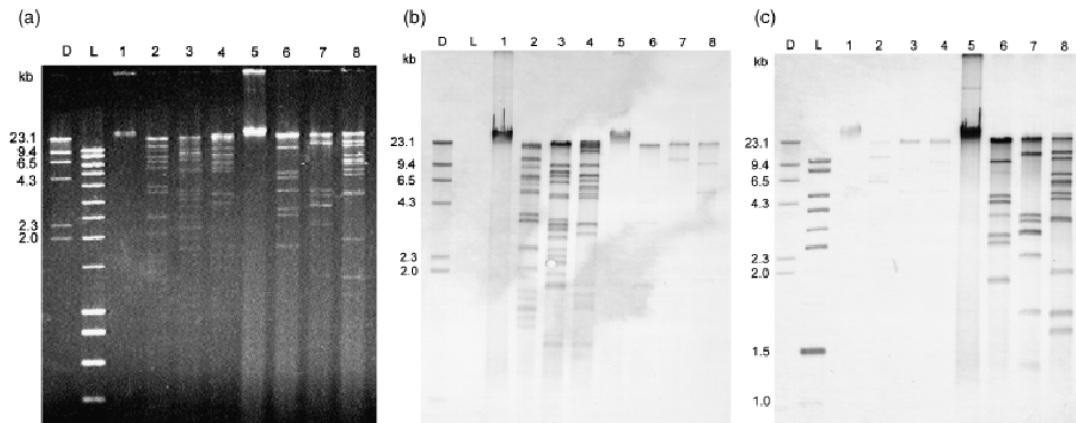
coexistência entre esses plasmídios (TABELA 2). Estes dados foram confirmados através do S1-PFGE, transferido para membranas e hibridizadas com sondas EHEC-hly e  $\alpha$ -hly específicas (oriunda de produtos de PCR item 3.2.2).

Os plasmídios pO157 e pEO5 coexistem estavelmente em amostras *E. coli* K12 transconjugantes - TPE2611, TPE477 e TPE497. O achado de que ambos os plasmídios pO157 e pEO5 são compatíveis entre eles, mas possuem diferentes genes de virulência indica que eles não estão intimamente relacionados (FIGURA 2).



**FIGURA 2-** Determinação do tamanho do plasmídio linear que codifica alfa hemolisina e enterohemolisina por hibridização do PFGE com sondas marcadas com digoxigenina específicas  $\alpha$ -hly e E-hly (a) DNA bacteriano tratado com nuclease S1 e separado por PFGE. LEGENDA: M, marcador de peso molecular para PFGE (Biolabs); 1, TPE422 (pEO5); 2, TPE1313 (pO157::Tn801); 3, TPE2611 (pO157::Tn801+ pEO5::Tn5); 4, TPE9866 (similar ao pEO5); e 5, TPE497 (pEO5::Tn5 + pO157) (b) hibridização por *southern blot* da membrana obtida da figura 2a com sonda construída por produto amplificado de PCR do gene  $\alpha$ -hlyA (c) hibridização por *southern blot* mostra a membrana obtida da figura 2a com uma sonda construída por produto amplificado de PCR do gene *ehxA*.

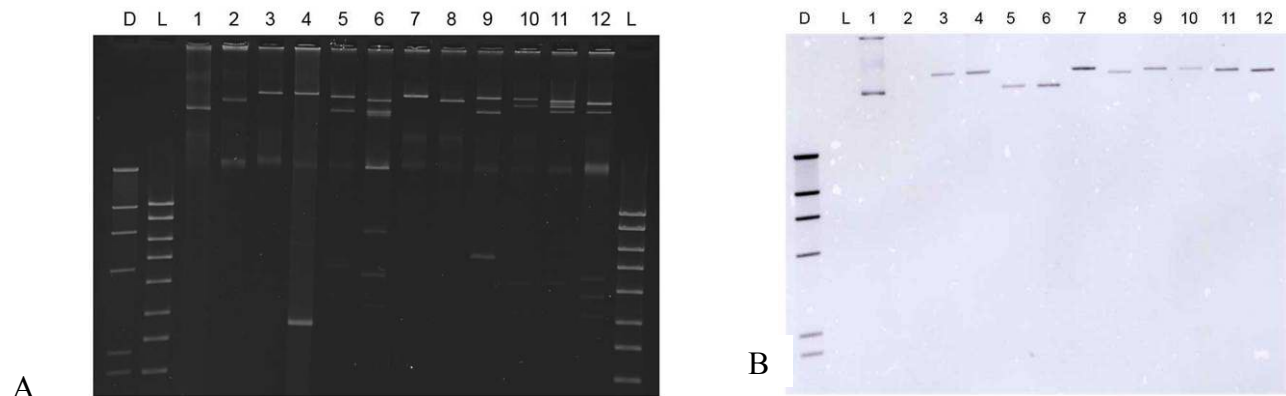
Utilizamos a sequência genética do plasmídio pO157 da amostra EDL933 (Número de acesso no GenBank AF74613) para observar sua relação com o pEO5. Para uma investigação completa da relação entre pEO5 e pO157, o DNA plasmidial de pEO5 (C4115) e pO157(EDL933) foi isolado, digerido com diferentes enzimas de restrição e usado para hibridização por *Southern blot* com sondas específicas. Nenhuma significância entre o DNA hibridizado dos plasmídios pEO5 e pO157 foi detectada, indicando que estes plasmídios não são similares entre eles (FIGURA 2 e 3).



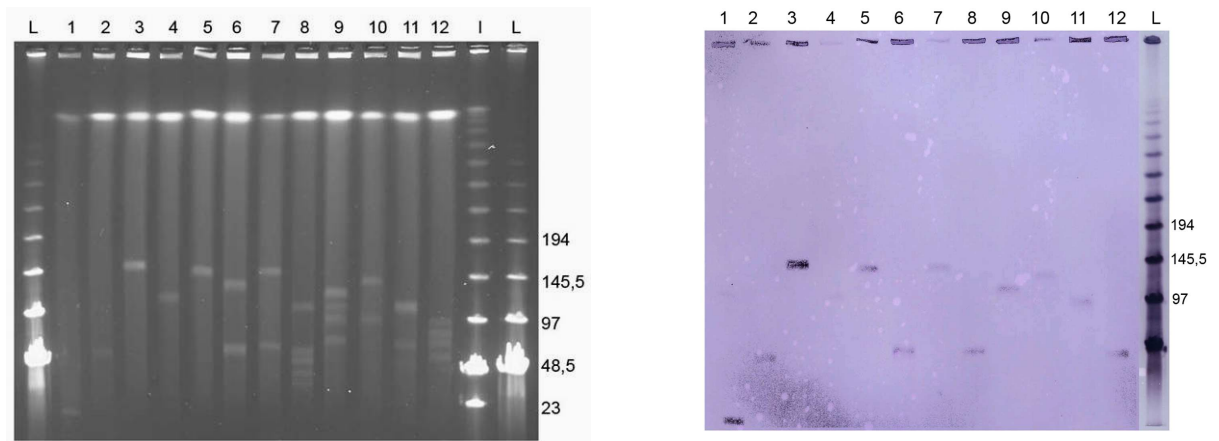
**FIGURA 3-** Perfil de restrição por endonucleases dos plasmídios pEO5 e pO157 e hibridizações por *southern blot* (a) Gel de agarose a 0,7% com DNA dos plasmídios pEO5 e pO157 de *E. coli* obtido em uma corrida eletroforética e digerido por diferentes enzimas de restrição (b e c) hibridização com sonda *ahly* e *Ehly* respectivamente. LEGENDA: (D) 23130pb DIG II (Roche) e (L) 10 000pb DNA ladder (Bioline), (1) pEO5, (2) pEO5 (*EcoRI*), (3) pEO5 (*HindIII*), (4) pEO5 (*ApalI*), (5) pO157, (6) pO157 (*EcoRI*), (7) pO157 (*HindIII*), (8) pO157 (*ApalI*) (b) Padrão de hibridização por *Southern blot* da linha 1 a 8 com sonda mista construída com pEO5 (*EcoRI/HindIII/apalI*) (c) padrão de hibridização por *Southern blot* da linha 1 a 8 com sonda mista construída pO157(*EcoRI/HindIII/apalI*).

#### 4.5 comparação do perfil do pEO5 com o perfil de outros plasmídios que codificam a alfa hemolisina localizados em outros patótipos de *E. coli*

As análises das sequências de nucleotídeos do plasmídio pEO5 e suas sequências adjacentes mostraram uma alta similaridade com a região correspondente do plasmídio pHly152. Como os plasmídios pEO5 e pHly152 são de origens e tamanhos diferentes, resolvemos analisar outras amostras que possuem o operon  $\alpha$  hemolítico em plasmídios para explorar a relação da herança do operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizado em plasmídios. Para isso, investigamos cinco amostras de ETEC isoladas de caninos (PRADA *et al.*, 1991) e quatro amostras de ETEC e STEC suínas (TABELA 1) que possuem o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizados em plasmídios de diferentes tamanhos. As amostras possuíam diversos plasmídios e a hibridização da membrana com sonda específica pode destacar os plasmídios que codificam alfa hemolisina (FIGURA 4). O tamanho do plasmídio linear que codifica alfa hemolisina obtido pela S1-PFGE e o resultado após a hibridização com sonda específica  $\alpha$ Hly marcada com digoxigenina pode ser observado na Figura 5.



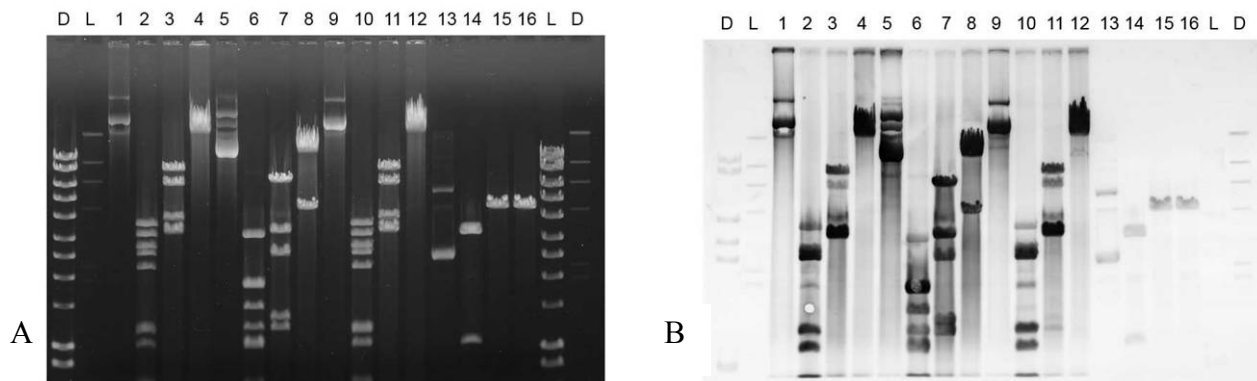
**FIGURA 4-** Diferentes tamanhos de plasmídios que codificam  $\alpha$  hemolisina isolados de diferentes amostras representativas. (A) Extração plasmidial pelo método de Kado e Liu (1978), em gel a 0,7% em eletroforese horizontal e (B) após hibridização. LEGENDA: Marcadores (D) 23130 pb DIG II (Roche) e (L) 10 000 pb DNA Ladder (Bioline). Linhas 1 a 12 amostras: (1) 374 (2) TPE 1313, (3) TPE422, (4) CB1030, (5) 3208/84, (6) 2573/84, (7) 2195/84, (8) 2S/84, (9) R/84, (10) CB853, (11) CB855, (12) CB857 (B) A sonda utilizada para hibridização foi construída a partir da amostra pSF4000 do produto de PCR para a região interna do gene *hlyC* (EO4f/4r).



**FIGURA 5-** Determinação pela S1-PFGE do tamanho do plasmídio linear que codifica alfa hemolisina, e após hibridização do PFGE com sonda específica  $\alpha$ -hly marcada com digoxigenina. A esquerda: DNA bacteriano digerido com nuclease S1 e separado por PFGE. LEGENDA: M, marcador de peso molecular para PFGE (Biolabs); (1) pSF4000 (12,5 kb); (2) 374 (48 kb-pHly152); (3) TPE422 (157 kb-pEO5); (4) 84/2S(97 kb);(5) 84/2195 (145 kb); (6) 84/3208 (48,5 kb), (7) 84/R (97 kb); (8) 84/2573 (48,5 kb), (9) CB855 (140 kb); (10) CB853 (145 kb); (11) CB857 (97 kb); (12) CB860 (48,5 kb). A direita após transferência para membrana e hibridização com sonda construída através do produto de PCR obtido com a amostra pSF4000 utilizando o iniciador EO4f/4r.

#### 4.6 Determinação da similaridade genética do plasmídio pEO5 em relação a outras amostras que possuam o operon que codifica alfa hemolisina

A construção do clone do pEO5 associado aos genes *ahlyCABD* no vetor pACYC184 foi realizado conforme descrito no item 3.2.5.3 do Material e Métodos. Entre 48000 transformantes cloranfenicol resistentes selecionados, apenas duas colônias com fenótipo  $\alpha$ Hly foram isoladas. Essas amostras pEO5 recombinantes foram chamadas de TPE2319 e TPE2320. O DNA foi hibridizado com fragmento *Sal*I-A. Esta sonda foi construída com plasmídio recombinante pSF4000 que abriga o operon inteiro clonado da amostra J96  *$\alpha$ HlyCABD* (WELCH *et al.*, 1983). TPE2319 e TPE2320 possuem aproximadamente 23 kb de inserção no pACYC184 hibridizado com a sonda *Sal*I-A. O vetor pACYC184 (TPE2321) e o plasmidio pSF4000 (TPE2318) foram usados como controles negativo e positivo respectivamente (FIGURA 6).

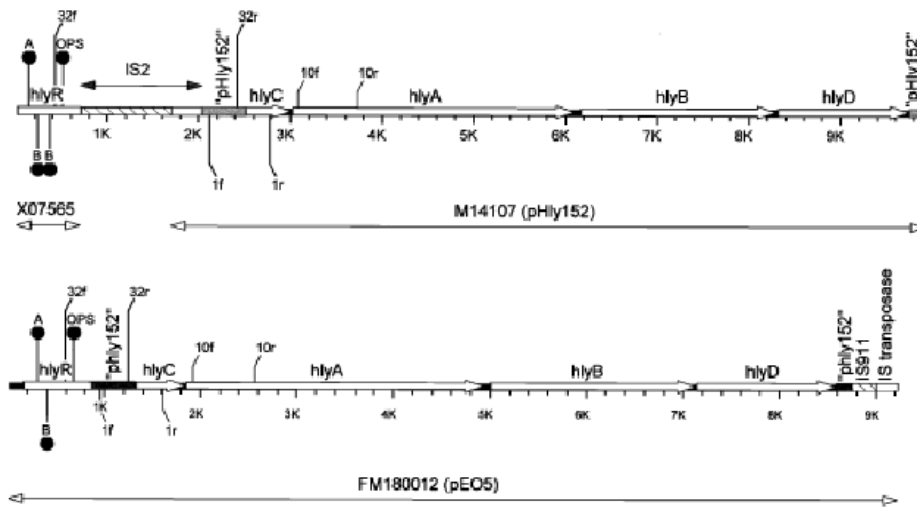


**FIGURA 6-** Corrida eletroforética com DNA plasmidial tratado com diferentes enzimas de restrição (A) Gel de agarose a 0,7% com DNA plasmidial recombinante de *E. coli* (B) hibridização por *Southern blot* com sonda  *$\alpha$ HlyCABD*. LEGENDA: Marcadores (D) 23130 bp DIG II (Roche) e (L) 10 000 bp DNA ladder (Bioline). Linhas: (1) TPE2319 íntegro, (2) TPE2319 (*Hinc*II), (3) TPE 2319 (*Eco*RI), (4) TPE2319 (*Sal* I), (5) TPE2318 íntegro, (6) TPE2318 (*Hinc*II), (7) TPE 2318 (*Eco*RI), (8) TPE2318 (*Sal* I), (9) TPE2320 íntegro, (10) TPE2320 (*Hinc*II), (11) TPE 2320 (*Eco*RI), (12) TPE2320 (*Sal* I), (13) TPE2321 íntegro, (14) TPE2321 (*Hinc*II), (15) TPE 2321 (*Eco*RI), (16) TPE2321 (*Sal* I) (B) padrão de hibridização por *Southern blot* do DNA das linhas 1 a 16 com sonda construída através do fragmento *sal*I-A de pSF4000.

O operon que codifica a alfa hemolisina localizado no plasmídio pHly152 (Número de acesso GenBank M14107) foi depositado no banco de acesso GeneBank separado do seu promotor *hlyR* (Número de acesso GenBank X07565) e, quando unidos com auxílio do programa *accelrys gene*, uma região ausente teve que ser



sequenciada. Essa região corresponde ao iniciador 32f/32r e foi sequenciada apenas com o intuito de comparação. O sequenciamento do pEO5 e suas regiões adjacentes foi depositado no GeneBank (Número de acesso GenBank FM180012) e o mapa detalhando as principais semelhanças entre o pEO5 e o pHly152 pode ser observado na Figura 7.



**FIGURA 7-** Mapa genético da região determinante e regiões adjacentes do pHly152 (GenBank M14107 e X07565) e do pEO5 (GenBank F180012). A região superior da figura mostra o mapa físico da região pHly152 que contém duas sequências nucleotídicas depositadas no genebank, a sequência a montante (GenBank X07565) representa a região promotora hlyR; a sequência M14107 corresponde ao operon *ahlyCABD*, que começa com uma região parcial de uma Sequência de Inserção (IS2) interrompida que termina após a região a jusante o gene *hlyD*. A região inferior da figura mostra todo o mapa físico do plasmídeo pEO5 sequenciado e suas regiões adjacentes (GenBank FM180012). Posições dos iniciadores 1f/1r, 10f/10r e 32f/r, que foram utilizados para a caracterização da região a montante hlyC presente em ambos plasmídios estão destacadas. A região denominada IS2 no pHly152 foi indentificada pela sequência do produto de PCR amplificado com os iniciadores 32f/r. A região designada “phly152” encontrada em ambos os mapas plasmidiais acima indica uma região não codificada, mas com alta homologia entre os plasmídios pEO5 e pHly152 (ver no texto). As seqüências regulatórias A, B e *ops* dentro da região do hlyR estão indicadas com círculos pretos.

A sequência derivada do plasmídeo pEO5 possui seqüências associadas à transposons em ambas as extremidades. Na extremidade a montante (*upstream*), foi encontrada uma extensão de 113 pb com 100% de similaridade com o gene transposase (Número de acesso GenBank AF453441). Uma região promotora de 702 pb com 98% de similaridade com o hlyR, região promotora do plasmídeo pHly152

(Número de acesso GenBank X07565) (VOGEL *et al.*, 1988), foi localizada entre a posição 165-867 (FM180012). A região promotora *hlyR* possui sequências regulatórias (A, B, B2 e *operon polarity supressor sequence* ou *ops*) que foram encontradas tanto em pEO5 quanto em pHly152.

A região de 465 pb a montante ao gene *hlyC* no pEO5 (868-1333) mostrou 99% de homologia com a região correspondente do pHly152 (Número de acesso GenBank M14107). Essa região chamada de “phly152” (FIGURA 7) não codifica uma ORF (HESS *et al.*, 1986). Os genes *hlyC* (1334-1846) e *hlyD* (7149-8585) do plasmídio pEO5 apresentaram 99% de similaridade com a sequência homóloga de genes correspondentes no plasmídio pHly152. Na extremidade a jusante (*downstream*), imediatamente após o gene *hlyD* foi localizada uma sequência de 155 pb (8586-8748) que possui 97% de similaridade com a sequência pHly152, seguida por um segmento de DNA de 255 pb (8749-9003) que mostrou 91% de similaridade com a sequência de inserção IS911 (Número de acesso GenBank X17613) da *Shigella dysenteriae*. Os últimos 223 pb (9004-9227) da sequência do plasmídio pEO5 mostraram 97% de similaridade com a IS transposase do plasmídio *E. coli* pCOO (Número de acesso GenBank CR942285).

O operon *ahlyCABD* do pEO5 mostrou uma homologia superior a 95% com os operons *ahlyCABD* localizados no cromossomo da amostra 536 inseridos na PAI I e PAI II.

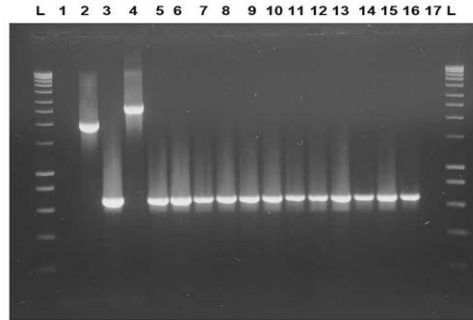
Para investigação de possíveis similaridades da região a montante ao gene *hlyC* com outros plasmídios semelhantes ao pEO5, foram desenvolvidos iniciadores específicos (1f+1r, TABELA 4 ) que amplificam o gene *hlyC* e região a montante ao gene *hlyC*. Todas as amostras alfa hemolíticas O26 investigadas amplificaram um produto de mesmo tamanho e o seu perfil de restrição com a enzima *Hinfi* foi similar (TABELA 5).

As sequências genômicas das amostras cujo operon que codifica alfa hemolisina estivesse localizado no cromossomo, tal como as amostras: CFT073 (Número de acesso GenBank AE014075), UTI89 (Número de acesso GenBank CP000243) e 536 (Número de acesso GenBank CP000247) foram testadas para esses iniciadores e nenhum produto foi amplificado, por isso, iniciadores específicos para a região a

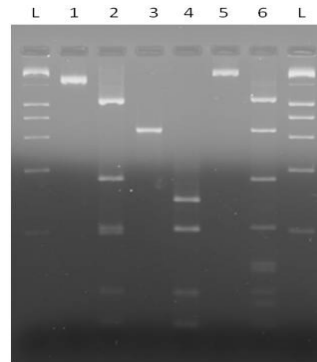
montante *hlyC* de amostras cujo operon que codifica  $\alpha$  hemolisina localizado em cromossomo foram desenhados com base na sequência da amostra 536 depositada no GenBank (Número de acesso GenBank CP000247) e encontram-se expostas na Tabela 4. Utilizando esses iniciadores todas as amostras que possuíam o operon que codifica alfa hemolisina localizado em plasmídios e cromossomo foram testadas (TABELA 1). A Amostra 536, que possui dois operons completos que codificam alfa-hemolisinas localizados no cromossomo em diferentes Ilhas de Patogenicidade, PAI I e PAI II (DOBRINT et al., 2002), serviu como controle positivo. Os resultados encontram-se na Tabela 5.

Os iniciadores específicos para a região localizada a montante *hlyC* do pEO5 (EO-1f/r) amplificaram um produto com 678 pb. Produtos de mesmo tamanho foram obtidos em todas as amostras cujo operon encontra-se em plasmídios e mostraram similaridade no perfil enzimático com a enzima de restrição *HinfI*, com exceção da amostra 84/2S (pEO14) que não amplificou essa região. Estes iniciadores também não amplificaram nenhuma amostra cujo operon alfa hemolítico estivesse localizado no cromossomo.

Os iniciadores desenhados para a região entre o promotor *hlyR* e a região a montante ao gene *hlyC* do pEO5 (EO32f + 32r) amplificaram um produto com 671 pb. Amplicons de mesmo tamanho foram obtidos por todas as amostras O26 que carregavam o plasmídio de tamanho semelhante ao pEO5, as amostras caninas 84/2195 e 84/R e a amostra suína CB860. Estes mesmos iniciadores produziram um amplicon com cerca de 2000 pb na amostra pHly152 e nas amostras caninas 84/3208 e 84/2573. Amplicons ainda maiores (2500 pb) foram obtidos com as amostras suínas CB853, CB855 e CB857 (FIGURA 8). Todos os amplicons de tamanho semelhantes (671 pb, 2000 pb e 2500 pb) geraram o mesmo perfil de restrição com a enzima de restrição *HinfI* (FIGURA 9). Todas as amostras cujo operon que codifica alfa hemolisina encontra-se no cromossomo foram negativas, assim como a amostra canina 84/2S para essa região.



**FIGURA 8** - Gel de eletroforese a 1% mostrando os três diferentes tamanhos de amplicons obtidos com iniciadores 32 f+r (que amplificam a região entre o promotor *hlyR* e o gene *hlyC*). LEGENDA:(L) marcador molecular 10 000 pb DNA Ladder (Biolabs), (1) padrão negativo K12, (2) 374 (amplicon de 2000 pb), (3) TPE422 (amplicon de 671 pb), (4) CB857 (amplicon de 2500 pb), (5) C4115 (671 pb), (6) TPE2319(671 pb), (7) TPE2320 (671 pb), (8) IP187 (671 pb), (9) CB1027 (671 pb), (10) CB1030 (671 pb), (11) CB9866 (671 pb), (12) TPE497 (671 pb), (13) 2195/84 (671 pb), (14) 84/R (671 pb), (15) CB860 (671 pb), (16) TPE2611 (671 pb), (17) tampão.



**FIGURA 9** – Perfil de restrição obtido com a enzima *apaLI* com os três tamanhos de amplicons encontrados com os iniciadores 32 f+r em gel de agarose a 2%. LEGENDA (L) marcador molecular 10 000 pb DNA Ladder (Biolabs), (1) produto de PCR da amostra 374 (2000 pb), (2) 374 (*apaLI*), (3) produto de PCR da amostra TPE422 (671 pb), (4) TPE422 (*apaLI*), 5) produto de PCR amostra CB857 (2500 pb), (6) CB857 (*apaLI*).

Sequências relacionadas com *HlyR* foram detectadas com os iniciadores 44f + 44r em todas as amostras cujo operon que codifica  $\alpha$  hemolisina estava localizado em plasmídios, exceto a amostra 84/2S. Já as amostras cujo operon localiza-se no cromossomo foram negativas para as sequências *hlyR*. O tamanho do amplicon produzido por esses iniciadores foi similar (685 pb) entre as amostras cujo operon

estava localizado em plasmídios, exceto as quatro amostras suínas CB853, CB855, CB857 e CB860, que apresentaram amplicons com 1400 pb. Os padrões obtidos com a digestão destes amplicons de 685 pb e 1400 pb pela enzima *HinfI* foram similares entre eles.

Todas as amostras de *E. coli* cujo operon que codifica alfa hemolisina encontra-se no cromossomo geraram produtos com os iniciadores 81f + 81r ou 72f + 72r ou ambos (TABELA 5), não detectado em nenhuma outra amostra que continha o operon que codifica alfa hemolisina localizado em plasmídio.

**TABELA 5-** Principais resultados encontrados nas amostras.

Amostra	Sorotipo	Fenótipo em Agar sangue	Plasmídeo (Kb)	Informações extras	5-1f+r (678 pb)	32f+r (671 pb)	44f+r (685 pb)	ehlyA (1551 pb)	PAI I 81f+r (773 pb <sup>1</sup> )	PAI II 72 (695 pb <sup>2</sup> )
C4115	O26:NM	a-Hly	pEO5 (157)	origem do pEO5 <sup>a</sup> (kanaR)	+	+	+	-	-	-
TPE422	Or:H48	a-Hly	pEO5 (157)	pEO5 em JC3272 <sup>a</sup> (StepR)	+	+	+	-	-	-
JC3272	Or:H48	-	-	K12, recipiente <sup>a</sup> (StrepR)	-	-	-	-	-	-
TPE2321	Or:H48	Hly-	pACYC184 (4.2)	vetor <sup>f</sup> (CloranfR)	-	-	-	-	-	-
TPE2319	Or:H48	a-Hly	pEO2319 (23)	(CloranfR, StrepR) <sup>c</sup>	+	+	+	-	-	-
TPE2320	Or:H48	a-Hly	pEO2320 (23)	(CloranfR, StrepR) <sup>c</sup>	+	+	+	-	-	-
CB9866	O26:NM	a-Hly	(157)	(TetraR) <sup>b</sup>	+	+	+	-	-	-
CB1027	O26:NM	a-Hly	(157)	b	+	+	+	-	-	-
CB1030	O26:NM	a-Hly	(157)	b	+	+	+	-	-	-
IP187	O26:NM	a-Hly	(157)	c	+	+	+	-	-	-
CB5805	O26:NM	a-Hly	(157)	(VT2, eae)	+	+	+	-	-	-
1040/83	O26:H11	E-hly	E-hly pO26 (97)	(KanaR) <sup>c</sup>	-	-	-	+	-	-
TPE497	Or:H48	a-Hly	pEO5 (157) + Ehly pO26 (97)	pEO5 em 1040/83 transconjugante (KanaR) <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	-
TPE1313	Or:H48	E-hly	pO157::tn801 (97)	(StepR, AmpR) <sup>g</sup>	-	-	-	+	-	-
TPE2611	Or:H48	a-Hly	pO157::Tn801 + pEO5::Tn5	TPE477xTPE1313	+	+	+	+	-	-
698/83	O26:H32	Hly-	-	c	-	-	-	-	-	-
84/2195	ONT:H10	a-Hly	pEO9 (157)	pEO9 <sup>h</sup>	+	+	+	-	-	-
374	Or:H48	a-Hly	pHly152 (48)	<i>E. coli</i> K12-pHly152 <sup>d</sup>	+	2000pb	+	-	-	-
84/3208	O42:H37	a-Hly	pEO11 (48)	(ILA,STA) <sup>h</sup>	+	2000pb	+	-	-	-
84/2573	O70:NM	a-Hly	pEO12 (48)	(ILA,STA) <sup>h</sup>	+	2000pb	+	-	-	-
84/R	O121:H46	a-Hly	pEO13 (97)	(CNF1) pEO13 não transf. <sup>h</sup>	+	+	+	-	-	-
84/2S	O75:H2	a-Hly	pEO14 (97)	(ILA, CNF1) não transf. <sup>h</sup>	-	-	-	-	-	-
CB853	O138:NM	a-Hly	pEO853 (157)	(VT2, F107) <sup>c</sup>	+	2500pb	1400 pb	-	-	-
CB855	Or:NM	a-Hly	pEO855 (140)	(VT2, F107) <sup>c</sup>	+	2500pb	1400 pb	-	-	-
CB857	O157:NM	a-Hly	pEO857 (97)	(strepR, F107,ST) <sup>c</sup>	+	2500 pb	1400 pb	-	-	-
CB860	O149:	a-Hly	pEO860 (48)	(strepR K88, LT) <sup>c</sup>	+	+	1400 pb	-	-	-
Goe 575 (536)	O6:K15:H31	a-Hly	-	536 <sup>i</sup>	-	-	-	-	773 pb	695 pb

(Continua)

Tabela 5 (continuação)

Amostra	Sorotipo	Fenótipo em Agar sangue	Tamanho do plasmídeo (Kb)	Informações extras	5-1f+r (678 pb)	32f+r (671 pb)	ehlyA (1551 pb)	44f+r (685 pb)	PAI I 81f+r (773 pb <sup>1</sup> )	PAI II 72 (695 pb <sup>2</sup> )
Goe 644 (536)	O6:K15:H31	a-Hly	-	536 <sup>i</sup>	-	-	-	-	-	695 pb
573/83	O25:K7:H1	a-Hly	-	-	-	-	-	-	-	695 pb
695/83	O126:H27	a-Hly	-	I	-	-	-	-	931 pb	-
U4-41	O4:K3:H5	a-Hly	-	I	-	-	-	-	+	+
J96 (CB9818)	O4:	a-Hly	-	J96	-	-	-	-	>863 pb	695 pb
WAF100	Or:H48	a-Hly	pSF4000 (12.5)	αHly J96 <sup>e</sup>	-	-	-	-	<828 pb	-

(a) BEUTIN *et al.* (1986), (b) LEOMIL *et al.* (2005), (c) Esse estudo, (d) HESS *et al.* (1986), (e) WELCH *et al.*, (1983) GenBankM10133, (f) ROSE *et al.* (1988) GenBank X06403, (g) SCHMIDT *et al.* (1994), (h) PRADA *et al.* (1991) e (i) PRADA *et al.* (1992). (1) calculado a partir do GeneBank número de acesso AJ488511 PAI I<sub>536</sub>; (2) calculado a partir do GeneBank número de acesso AJ494981.1 PAI II<sub>536</sub> (DOBRINDT *et al.*, 2002). Dados incluídos nas informações extras foram obtidos por PCR apenas para a confirmação dos patótipos exibidos na Tabela 1 (K88, LT, ST, CNF1, F107, VT1, VT2, eae), dados referentes a ILA (teste com alça ligada), foram realizados por PRADA *et al.*, (1991), dados referentes a resistência a antibióticos foram testados neste estudo em placas com as quantidades descritas no Material e Método no item 3.2.4.2. LEGENDA: kanaR= kanamicina resistente, ampR= ampicilina resistente, StrepR= estreptomicina resistente, TetraR= tetramicina resistente, cloranfR= cloranfenicol resistente.

(Conclusão)

## 5 DISCUSSÃO

As onze amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 que possuíam os genes associados à produção de alfa hemolisina, utilizadas em nosso estudo, apresentaram-se positivas para os iniciadores desenhados para o pEO5 (TABELA 3), obtendo o mesmo tamanho nos fragmentos amplificados. Essas amostras também expressavam em agar sangue o perfil alfa hemolítico. De acordo com Bielaszewska *et al.* (2005), esse padrão de  $\alpha$  hemolisina foi o único expresso em 33 amostras de EPEC atípicas O26 estudadas. Leomil *et al.* (2005), observaram, através da PCR, que as amostras de EPEC atípicas do sorogrupo O26 que apresentavam o perfil fenotípico  $\alpha$ Hly também eram positivas para o iniciador que amplifica o gene *hlyA*.

Ainda segundo Leomil *et al.* (2005) amostras do sorogrupo O26 encontram-se em dois grupos clonais diferentes, diferenciadas pelo seu fenótipo, fatores de virulência e perfil genético. Amostras EPECa e EHEC, quando hemolíticas, apresentam o fenótipo enterohemolítico em placas de agar sangue. Essas amostras também se caracterizam por serem não fermentadoras da Ramnose e Dulcitol. Por outro lado, o outro grupo clonal é composto apenas por EPEC atípicas, agrupadas em um único “cluster”. Todas eram fermentadoras de Ramnose e Dulcitol, positivas para intimina e quando hemolíticas em agar sangue apresentavam o fenótipo alfa hemolítico.

No nosso estudo, entre as 11 amostras de O26 que apresentavam o operon que codifica a alfa hemolisina localizada em plasmídio, destacamos a amostra CB5805, de origem humana, alfa hemolítica e positiva para o gene *stx<sub>2</sub>*. O padrão alfa hemolítico em amostras STEC positiva para o gene *stx<sub>2</sub>* havia sido descrito por Lehmacher *et al.* (1998) em sorotipos isolados de suínos O138:K81, O139:K82 e O141:K85, e era considerado um padrão descrito exclusivamente em amostras animais. Raras descrições mostram a ocorrência da  $\alpha$ -hemolisina em amostras de STEC isoladas de humanos, mas corroborando com nosso achado, Beutin *et al.* (2004) descreveram que entre 576 amostras isoladas de crianças da Alemanha que expressavam hemolisina em agar sangue, apenas duas amostras positivas para o gene *stx<sub>2</sub>* (ONT:H10 e ONT:H45) apresentavam o perfil fenotípico alfa, enquanto as demais tinham o perfil fenotípico enterohemolítico. A amostra CB5805 pode ser um exemplo do fenômeno observado por



Bielaszewska *et al.* (2007), que descreveram um movimento genético observado *in vitro* bidirecional entre EPEC atípica O26 e EHEC O26, ainda não esclarecido, onde o gene *stx<sub>2</sub>* pode ser incorporado ao material genético ou a perdido, convertendo-se novamente em EPEC atípica.

Todos os plasmídios que codificam alfa hemolisina encontrados nas 11 amostras do sorogrupo O26 que apresentaram o perfil fenotípico alfa em agar sangue, quando submetidas a S1-PFGE, mostraram semelhança com o plasmídio pEO5 com relação ao tamanho, sendo de aproximadamente de 157 kb. Todas as outras características estudadas como a capacidade de conjugação, o tamanho dos amplicons obtidos pelos iniciadores testados e o perfil de restrição apresentados também foram similares com os apresentados pelo pEO5. Essa similaridade com relação ao tamanho do pEO5 foi observada por Beutin *et al.* (1988), através de hibridização de membrana, em oito amostras que possuíam o fenótipo alfa hemolítico em agar sangue. Este achado indica que os plasmídios que codificam alfa hemolisina em cepas pertencentes ao sorogrupo O26 são similares entre si, apesar de não serem epidemiologicamente relacionados.

No nosso estudo, verificamos que entre as 24 amostras que continham o operon *ahlyCABD* localizado em plasmídio testadas para averiguação da capacidade de transferência de informações por conjugação, os plasmídios pEO13 (84/R) e pEO14 (84/2S) isolados de amostras caninas e o pEO860 (CB860), isolado da amostra suína foram os únicos que não transferiram o operon para a amostra identificada como receptora (TABELA 5). As amostras cujo operon codificava enterohemolisina mostraram-se não conjugativas. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Beutin *et al.* (1986), que observaram que o pEO5 era capaz de conjugar-se com amostras não hemolíticas e manter-se estável por diversas gerações. Posteriormente, Grünig e Lebek (1988) e Prada *et al.* (1991), também descreveram que os plasmídios que contêm o operon que codifica  $\alpha$  hemolisina isolado de amostras de *E. coli* diferentes origens eram conjugativos em sua grande maioria. Por outro lado, o plasmídio que codifica enterohemolisina, isolado de amostras de EHEC dos sorogrupos como O26, O103, O111, O145 e O157, foi descrito como não conjugativo (SCHMIDT *et al.*, 1995; BRUNDER *et al.*, 1999) e defectivo no seu sistema de transferência de genes, razão de sua limitada difusão entre as espécies de *E. coli* (BURLAND *et al.*, 1998).

As amostras recombinantes construídas anteriormente (TPE477, Beutin *et al.*, 1986) e neste estudo (TPE2611 e TPE497) mostraram que apesar do plasmídeo que codifica enterohemolisina não ser conjugativo, aceitou a coexistência com o plasmídeo pEO5. Esse achado não havia sido descrito até o momento e demonstra que o plasmídeo pEO5 de EPEC atípica do sorotipo O26 não é geneticamente relacionado com o plasmídeo de EHEC O26, indicando que a enterohemolisina e a  $\alpha$  hemolisina são codificadas por plasmídios diferentes em amostras de EPEC e EHEC deste sorogrupo.

A presença de genes como *katp*, *espP*, *toxB* e *exhA* em amostras do sorogrupo O26 de EHEC (LEOMIL *et al.*, 2005) foi constatada também por autores como Cookson *et al.* (2007) e Jenkins *et al.* (2007). Esses genes são similares aos codificados pelo pO157 e já foram descritos em plasmídeo de tamanho similar ao pO157 em amostras do sorogrupo O26 de STEC (Jenkins *et al.*, 2000), sorotipo O103:H2 de EHEC (KARAMA *et al.*, 2008) e também em outros sorogrupos como O111 e O145 (ALDICK *et al.*, 2009). Apesar de aparentemente se tratar do mesmo plasmídeo albergado em outras amostras de STEC patogênicas, Burgos *et al.* (2009) o descreveram como pO26, por ter sido isolado de uma amostra EHEC O26 com fenótipo Ehly.

O tamanho dos plasmídios contendo o operon que codifica alfa hemolisina em cepas de *E. coli* de caninos, suínos, roedores, bovinos e humanos avaliados neste trabalho variou entre 12,5 kb e 157 kb. Segundo autores como De La Cruz *et al.* (1980) e Prada *et al.* (1991) os plasmídios que possuem o operon que codifica alfa hemolisina são descritos como heterogêneos em relação ao tamanho e comportamento de conjugação mas dividem uma alta homologia genética entre as alfa hemolisinas.

Estudos epidemiológicos mostraram que  $\alpha$  hemolisinas codificadas por plasmídios são freqüentemente associadas com ETEC e STEC causando doenças entéricas em animais (PRADA *et al.*, 1991; BERTSCHINGER e GYLES, 1994; BEUTIN, 1991) e alguns autores acreditam que a produção de  $\alpha$  hemolisinas contribui para a virulência da bactéria e favorece a proliferação desta no intestino (WU *et al.*, 2007). A presença de diferentes tamanhos de plasmídios que codificam a  $\alpha$  hemolisina encontradas em nosso estudo também foi observada por Grünig e Lebek (1988).

Grünig e Lebek (1988) avaliaram a atividade hemolítica dos plasmídios e plasmídios recombinantes contendo o operon  $\alpha$  hemolítico e relataram uma baixa

atividade hemolítica do pEO5 quando comparada ao pHly152. Plasmídios que codificam hemolisina isolados de amostras fecais humanas possuem uma atividade hemolítica baixa enquanto que amostras cujo operon  $\alpha$  hemolítico está localizado ao cromossomo possuem uma atividade hemolítica maior. Essas diferenças na atividade hemolítica não são notadas na expressão fenotípica em agar sangue e mais estudos devem ser realizados a *posteriori* para avaliar essa atividade hemolítica através de transcriptase reversa PCR com RNA.

Os dados referentes à diferença entre os produtos de amplicon obtidos para os iniciadores utilizados (TABELA 5) também requerem maiores estudos. Anterior ao nosso trabalho apenas a seqüência pHly152 era utilizada como base de comparação para os demais operons que codificam hemolisina. A partir do nosso sequenciamento observamos que as seqüências encontradas, apesar da alta similaridade com pHly152, apresentou pequenas diferenças, especialmente com o iniciador 32 f+r. O iniciador 44 f+r, também apresentou diferenças de tamanho de amplicon. Esses dados corroboram com os achados anteriores por Knapp *et al.* (1985), que observaram que a região a montante do operon *hlyCABD* é geneticamente diferente entre as amostras de *E. coli* quando o operon é carregado em plasmídio ou no cromossomo.

Como a enterohemolisina, a  $\alpha$  hemolisina pode participar do processo de infecção intestinal em humanos, ocasionado por *E. coli*. A enterohemolisina e a  $\alpha$  hemolisina são capazes de causar danos celulares e iniciar o processo de inflamação de mamíferos hospedeiros (ALDICK *et al.*, 2007; TROEGER *et al.*, 2007). Estas possuem apenas 60% de homologia genética (SCHIMDT *et al.*, 1995). Em compensação a comparação entre plasmídios e cromossomos codificadores de fatores determinantes  $\alpha$  hemolítico revelam até 98% homologia entre as seqüências que contém os genes *hlyCABD*, sugerindo uma origem em comum. Entretanto, pouca similaridade foi encontrada na região a montante ao gene *hlyC* (GRÜNIG e LEBEK, 1988). Segundo Hess *et al.* (1986) amostras cujo operon  $\alpha$  hemolítico encontra-se em plasmídios apresentam-se interrompidas por uma seqüência de inserção IS2 a montante e outra IS a jusante dos genes *hlyCABD*. Estas seqüências estão ausentes nas amostras cujo operon está em cromossomo.

A análise da sequência nucleotídica do operon *hlyCABD* do pEO5 revelou uma alta similaridade com os genes *ahlyCABD* presentes no pHly152, contrastando com a origem, tamanho do plasmídeo e sorotipo das amostras analisadas. As sequências regulatórias (A, B e B2) localizadas no regulador *hlyR* e a região a montante, identificada como “pHly152” na Figura 7, descritas por Vogel *et al.* (1988) como potencializadoras da síntese e secreção de  $\alpha$  hemolisina no pHly152, foram também detectadas no pEO5. Em adição, o *ops* é necessário para a transcrição do operon que codifica  $\alpha$  hemolisina (NIETO *et al.*, 1996; LEEDS e WELCH, 1997). Ele está localizado no *hlyR* a 648 pb da região a montante do *start* códon do gene *hlyC*. Este elemento *ops* foi encontrado na sequência de pHly152 (Número de acesso GenBank X07565) e também a 334 pb e 667 pb a montante do gene *hlyC*, em amostras cujo operon  $\alpha$  hemolítico encontra-se localizado em cromossomo (NAGY *et al.*, 2006). Entretanto amostras cujo operon *ahlyCABD* esteja localizado no cromossomo não apresentam a região regulatória específica do plasmídeo (*hlyR*), a região chamada de “phly152”, além de não ter similaridade genética com a região a montante *hlyC* das amostras que possuem os plasmídios pHly152 e pEO5 (KNAPP *et al.*, 1985; NAGY *et al.*, 2006).

A aquisição de plasmídios que codificam  $\alpha$  hemolisina ocorre supostamente por transferência horizontal de gene através de sequência de inserção (IS). No presente estudo, esses elementos de transporte foram encontrados em ambas as terminações da sequência pEO5, indicando que este operon e suas sequências adjacentes podem ter sido introduzidas através de IS para *E. coli*. Esses achados estão de acordo com os descritos por Wagner (2006) que refere-se aos elementos de inserção (IS) como a chave para a mobilidade genética.

O interesse em sequenciar o gene da  $\alpha$  hemolisina presente no plasmídeo pEO5 associado a EPEC O26 surgiu devido a ausência de dados sobre operons que codificam  $\alpha$  hemolisina localizados em plasmídios isolados de amostras humanas. Até o presente momento apenas uma sequência de  $\alpha$  hemolisina localizada em plasmídeo havia sido sequenciada. Esta amostra (Número de acesso GenBank M1410) foi isolada de roedor por Hess *et al.* (1986) e sempre comparada, em pesquisas de homologia, com amostras humanas cujo operon que codifica  $\alpha$  hemolisina encontram-se no cromossomo. Uma pesquisa realizada no BLAST ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) com as

sequências do pEO5 na região entre *hlyR* e *hlyC* e a região a jusante ao gene *hlyD* revelaram apenas homologia com pHly152.

Nossas pesquisas de similaridade revelaram que, o pEO5 (que codifica uma alfa hemolisina) e o pO157 (que codifica uma enterohemolisina), apesar de estarem presentes em amostras O26 de EPEC atípica e O26 de EHEC, respectivamente, estão mais distantes na evolução, por possuírem uma similaridade de apenas 61,4%, do que o plasmídeo pEO5 e relação ao pHly152 (que codifica uma alfa hemolisina), que apresentou uma homologia de 99,2%. Essa alta homologia genética também foi encontrada entre pEO5 e a amostra 536, que possui dois operons que codificam duas alfa hemolisinas localizados no cromossomo (PAI I apresenta uma homologia de 95,7% e PAI II de 96,3% com pEO5) sugerindo que as alfa hemolisinas apresentam-se mais relacionadas entre si.

## 6 CONCLUSÕES

- As amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 de origem humana e animal apresentaram-se similar ao pEO5 quanto à presença dos genes associados à produção de alfa hemolisina ( $\alpha$ Hly ) e bem distante das amostras do mesmo sorogrupo que possuíam o pO157;
- A maioria dos plasmídios que codificam alfa hemolisina estudados foram capazes de promover conjugação mas não existe uma uniformidade ou padrão observado entre todos os plasmídios;
- Os plasmídios pEO5 e pO157 foram compatíveis em amostras recombinantes e apresentaram baixa similaridade, corroborando com a não relação entre estes dois plasmídios;
- O perfil do plasmídio que contem o operon que codifica a alfa hemolisina nas amostras de *E. coli* do sorogrupo O26 analisadas apresentaram similaridades com relação a tamanho e mesmas características do plasmídio pEO5;
- O perfil do pEO5 difere do perfil de outros plasmídios que codificam alfa hemolisina localizados em outros patótipos de *E. coli*;
- O plasmídio pEO5 apresenta similaridade genética maior (99,2%) com o plasmídio pHly152 e com amostras cujo operon que codifica alfa hemolisina localizado no cromossomo (95,7% com PAI I e 96,3% com PAI II) do que com o pO157 (61,4%).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALDICK, T.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; BROCKMEYER, J.; SCHMIDT, H.; FRIEDRICH, A. W.; KIM, K. S.; SCHMIDT, M. A. ; KARCH, H. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. **Microbes Infect.**, v.9, p. 282-290, 2007.

ALDICK, T.; BIELASZEWSKA, M.; UHLIN, B. E.; HUMPF, H. H.; WAI, S. N.; KARCH, H. Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. **Mol. Microbiol.**, 71, p. 1496-1508, 2009.

ANDERSEN, C.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Chunnel vision. **Embo Reports.**, v. 41, p. 313-318, 2000.

BARTON, B. M.; HARDING, G. P.; ZUCCARELLI, A. J. A general method for detection and sizing large plasmid. **Anal. Biochem.**, v. 226, p. 235-240, 1995.

BAILEY, M. J. A.; KORONAKIS, V.; SCHMOLL, T.; HUGHES, C. *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. **Mol. Microbiol.**, v. 8, p. 1003-1012, 1992.

BERTSCHINGER, H. U.; GYLES, C. L. Oedema Disease of Pigs. In: GYLES, C. L. (Ed.). ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 193-219.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Characterization of Hemolytic strains of *Escherichia coli* belonging to classical Enteropathogenic O-serogroups. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A**, v. 261, p. 266-279, 1986.

BEUTIN, L.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; ÖRSKOV, I.; ÖRSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A**, v. 267, p. 576-588, 1988.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEUTIN, L.; BODE, L.; ÖZEL, M.; STEPHAN, R. Enterohemolysin production is associated with temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strain. **J. Bacteriol.**, v.172, p. 6469-6475, 1990.

BEUTIN, L. the different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol.**, v.180, p. 167-182, 1991.

BEUTIN, L.; BÜLTE, M.; WEBER, A.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. **Epidemiol. Infect.**, v.125, p. 47-54, 2000.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.1099-1108, 2004.

BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; TARR, P. I.; SONNTAG, A. K.; KARCH, H. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. **J. clin. Microbiol.**, v.43, p. 4225-4228, 2005.

BIELASZEWSKA, M.; PRGER, R.; KÖCK, R.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; TSCHÄPE, H.; TARR, P. I.; KARCH, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3144-3150, 2007.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; DAHABI, G.; COIRA, M. A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 311-319, 2004.

BRASHEARS, M. M.; GALYEAN, M. L.; LONERAGAN, G. H.; MANN, J. E.; KILLINGER-MANN, K. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 748-754, 2003.

BRUNDER, W.; KARCH, H.; SCHMIDT, H. Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H strain 3072/96. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, p. 467-474, 2006.



BURGOS, Y. K.; PRIES, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BEUTIN, L. Characterization of the  $\alpha$  hemolysin determinant from the human enteropathogenic *Escherichia coli* O26 plasmid pEO5. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 292, p. 192-202, 2009.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H. J.; BLATTNER, F.R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, p. 4196-4204, 1998.

BRZUSZKIEWICZ, E.; BRÜGGEMANN, H.; LIESEGANG, H.; EMMERTH, M.; ÖLSCHLÄGER, T.; NAGY, G.; ALBERMANN, K.; WAGNER, C.; BUCHRIESER, C.; EMÖDY, L.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **PNAS.**, v. 103, p. 12879-12884, 2006.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E.; RIZZONI, G.; KARCH, H. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. **Emerg. Infect. Dis.** v. 4, p. 578-579, 1997.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, p. 289-311, 2005.

CAVALIERI, S. J.; GREGORY, A. B.; SNYNDER, I. S. *Escherichia coli*  $\alpha$ - Hemolysin: characteristic and probable role in pathogenicity. **Microbiol. Reviews.**, v. 48, p. 326-343, 1984.

CHANG, A. C. Y.; COHEN, S. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid. **J. Bacteriol.**, v.134, p.1141-1156,1978.

COOKSON, A. L.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G. T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p. 6360-6369, 2007.

CORTAJARENA, A. L.; GONI, F. M.; OSTOLAZA, H. A. receptor-binding region in *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.19159-19263, 2003.

CORTAJARENA, A. L.; GONI, F. M.; OSTOLAZA, H. asp-863 is a key residue for calcium-dependent activity of *Escherichia coli* RTX toxin  $\alpha$ -haemolysin. **FEBS Lett.**, v. 546, p. 271-275, 2003.

CZUPRYNSKI, C. J., WELCH, R. A. Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. **Trends. Microbiol.** v. 12, p. 480-483, 1995.

DE LA CRUZ, F.; MÜLLER, D.; ORTIZ, J.M.; GOEBEL, W. Hemolysin determinant common to *Escherichia coli* hemolytic plasmid of different incompatibility groups. *J. Bacteriol.*, v. 143, p. 825-833, 1980.

DOBRINDT, U.; JANKE, B.; PIECHACZEK, K.; NAGY, G.; ZIEBUHR, W.; FISCHER, G.; SCHIERHORN, A.; HECKER, M.; BLUM-OEHLER, G.; HACKER, J. Toxin genes on Pathogenicity Islands: impact for microbial evolution. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 307-311, 2000.

DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLER, G.; NAGY, G.; SCHNEIDER, G.; JOHANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J. Genetic structure and distribution of four Pathogenicity Islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6365-6372, 2002.

DONNENBERG, M. S. ***Escherichia coli***: virulence mechanisms of a versatile pathogen. California: Academic Press, 2002. 416 p.

FELMLEE, T.; PELLETT, S.; WELCH, R. A. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* chromosomal Hemolysin. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 94-105, 1985.

GERBER, A.; KARCH, H.; ALLERBERGER, F.; VERWEYEN, H. M.; ZIMMERHACKL, L. B. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 493-500, 2002.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uraemic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v.13, p. 60-98, 1991.

GRÜNIG, H. M.; RUTSCHI, D.; SCHOCH, C.; LEBEK, G. The chromosomal Fur gene regulates the extracellular haemolytic activity encoded by certain Hly plasmid. **Zbl. Bakt. Hyg. A.**, v. 266, p. 231-238, 1987.

GRÜNIG, H. M.; LEBEK, G. Haemolytic activity and characteristics of plasmid and chromosomal borne Hly genes isolates from *E. coli* of different origin. **Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. A.**, v. 247, p. 485-494, 1988.

GUTH, B. E. C.; SOUZA, R. L.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 535-536, 2002.

HACKER, J.; HUGHES, C. Genetic form *E. coli* hemolysins. **Cur. Top. Microbiol. Immunol.** v. 118, p. 139-162, 1985.

HAMPSON, D. J.; FU, Z. F.; BETTLEHEIM, K. A.; WILSON, M.W. Managemental influences on the selective proliferation of two strains of haemolytic *Escherichia coli* in weaned pigs. **Epidemiol. Infect.**, v.100, p. 213-220, 1988.

HESS, J.; WELS, M.; VOGEL, M.; GOEBEL, W. Nucleotide sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 34, p. 1-11, 1986.

HIRAMATSU, R.; MATSUMOTO, M.; MIWA, Y.; SUZUKI, Y.; SAITO, M.; MIYAZAKI, Y. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 922-925, 2002.

JENKINS, C.; EVANS, J. CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; FRANKEL, G. *Escherichia coli* serogroup O26 – a new look at an old adversary. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 14-25, 2007.

KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. **J. Bacteriol.**, v.145, p.1365-1373, 1981.

KARAMA, M.; JOHNSON, R. P.; HOLTSLANDER, R.; GYLES, C. L. Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. **J. clin. Microbiol.**, v. 46, p. 3569-3575, 2008.

KARMALI, M. A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K. J.; SHELLEY Y.; REID S., R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J., B. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4930-4940, 2003.

KERÉNYI, M.; ALLISON, H. E.; BÁTAI, I.; SONNEVEND, Á.; EMÖDY, L.; PLAVECZKY, N.; PÁL, T. Occurrence of *hly* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2965-2968, 2005.

KESKIMAKI, M.; SAARI, M.; HEISKANEN, T.; SHITONEN, A. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3641-3646, 1998.

KNAPP, S.; THEN, I.; WELS, W.; MICHEL, G.; TSCHAPE, H.; HACKER, J.; GOEBEL, W. Analysis of the flanking regions from different haemolysin determinants of *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 200, p. 385-392, 1985.

KORONAKIS, V.; CROSS, M.; SENIOR, B.; KORONAKIS, E., HUGHES, C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 1509-1515, 1987.

LALLY, E. T.; HILL, R. B.; KIEBA, I. R.; KOROSTOFF, J. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends. Microbiol.**, v.7, p. 356-361, 1999.

LEEDS, J. A.; WELCH, R. A. rfaH enhances elongation of *Escherichia coli hlyCABD* mRNA. **J. Bacteriol.**, v. 178, p.1850- 857, 1996.

LEEDS J. A.; WELCH, R. A. enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: rfaH and Upstream JUMPStart DNA sequences function together via postinitiation mechanism. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 3519-3527, 1997.

LEHMACHER, A.; MEIER, H.; ALEKSIC, S.; MOCKEMUHL, J. Detection of hemolysin variants of shiga toxin- producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2449-2453, 1998.

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains

which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 335-342, 2005.

LEVINE, M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LLOYD, A. L.; RASKO, D. A.; MOBLEY, H. L. T. Defining genomic Islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 3532-3546, 2007.

LOW, D. A.; BRATEN, B. A.; LING, G. V.; JOHNSON, D. L.; RUBY, A. L. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2601-2609, 1998.

MAINIL, J. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Vet. Res.** v. 30, p. 235- 257, 1999.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **FEMS. Microbiol. Lett.** v.252, p.183-190, 2005.

MORABITO, S.; TOZZOLI, R.; OSWALD, E.; CAPRIOLI, A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3343-3348, 2003.

NAGY, G.; ALTENHOEFER, A.; KNAPP, O.; MAIER, E.; DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLE, G.; BENZ, R.; EMODY, L.; HACKER, J. Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2006-2012, 2006.

NEELY, E.; BELL, C. FINLAY, D. MCCAPPIN, J.; WILSON, I.; BALL, H. J. Development of a capture/enrichment sandwich ELISA for the rapid detection of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26 strains. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 1161-1165, 2004.

NIETO, J. M.; BAILEY, M. J.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 705-713, 1996.

ORSKOV, F. **On the occurrence of *E. coli* belonging to o-group 26 in cases of infantile diarrhoea and white scours.** In: CONFERENCE ON INFECTIOUS DISEASES ARRANGED BY "THE SCOTTISH FEVER GROUP" AND BLEGDAMSHOSPITALET IN COPENHAGEN, 4<sup>th</sup>., July, 1951. **Conference...** Copenhagen, 1951.

PACIOREK, J. Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belong to serogroups O18, O26, O44, O86, O127 and O127 isolated from children with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 548-556, 2002.

PEARCE, M. C., FENLON, D., LOW, J. C., SMITH, A. W., KNIGHT, H. I., EVANS, J., FOSTER, G., SYNGE, B. A., GUNN, G. J. Distribution of *Escherichia coli* O157 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. **Appl. Environ. Microbiol.** v.10, p. 5737-5743, 2004.

PRADA, J.; BALJER, G.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; BEUTIN, L. Characteristics of  $\alpha$ -hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 59-73, 1991.

PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; BEUTIN, L. Restriction Fragment Length Polymorphisms associated with  $\alpha$ -hemolysin determinants are correlating with the expression of  $\alpha$ -Hemolysin in strains of *Escherichia coli*. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 276, p. 152-164, 1992.

ROSE, P. E.; TAYLOR, C. M.; KAVI, J. Pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome. **Lancet.** v.2, p. 580, 1988.

SCHMIDT, H.; KARCH, H.; BEUTIN, L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, p. 189-196, 1994.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1055-1061, 1995.

SCHRIJVER, K.; BUVENS, G.; POSSÉ, B.; VAN DEN BRANDEN, D.; OOSTERLYNCK, O.; ZUTTER, L.; EILERS, K.; PIÉRARD, D.; DIERICK, K.; VAN DAMME-LOMBAERTS, R.; LAUWERS, C.; JACOBS, R. Outbreak of verotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. **Eurosurveillance.**, v. 13, p. 1- 3, 2008.

SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. **J. infect. Dis.**, v. 162, p. 1069-1074, 1990.

SHEN, S.; MASCARENHAS, M.; RAHN, K.; KAPER, J. B.; KARMALI, M. A. Evidence for a hybrid genomic island in Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* CL3 (serotype O113:H21) containing segments of EDL933 (serotype O157:H7) O island 122 and 48. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1496-1503, 2004.

SIGUIER, P.; FILÉE, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 526-531, 2006.

SMITH, H. W.; LINGGOOD, M. A. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 4, p. 467-485, 1971.

STRATHDEE, C. A.; LO, R. Y. Extensive homology between the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 and the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 3233-3236, 1987.

SZALO, I. M.; TAMINIAU, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MCCAPPIN, J.; BALL, H. J.; MAINIL, J. G. 2F3 Monoclonal antibody recognizes the O26 O-antigen moiety of the lipopolysaccharide of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 4276. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, p. 532-537, 2004.

TANEIKE, I.; ZHANG, H. M.; WAKISAKA-SAITO, N.; YAMAMOTO, T. Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. **FEBS Lett.**, v. 524, p. 219-224, 2002.

TOZZI, A.E.; CAPRIOLI, A.; MINELLI, F.; GIANVITI, A.; de PETRIS, L.; EDENFONTI, A.; MONTINI, G.; FERRETTI, A.; de PALO, T.; GAIDO, M.; RIZZONI, G. The hemolytic Uremic Syndrome study group. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections

associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 106-108, 2003.

TOZOLLI, R.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Detection of *tox*B, a Plasmid Virulence Gene of *Escherichia coli* O157, in Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4052-4056, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 563 p.

TROEGER, H.; RICHTER, J. F.; BEUTIN, L.; GUNYEL, D.; DOBRINDT, U.; EPPLE, H.J.; GITTER, A. H.; YEITZ, M.; FROMM, M.; SCHLZKE, J. D. *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. **Cell. Microbiol.**, v.1, p.1-11, 2007.

VOGEL, M.; HESS, J.; THEN, I.; JUAREZ, A.; GOEBEL, W. Characterization of a sequence (*hly*R) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 212, p. 76-84, 1988.

WAGNER, A. cooperation is fleeting in the world of transposable elements. **PLoS Comput. Biol.**, v. 12, p. 1522-1529, 2006.

WELCH, R. A.; HULL, R.; FALKOW, S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *E. coli*. **Infect. Immun.**, v. 42, p. 178-186, 1983.

WELCH, R. A.; PELLET, S. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 1622-1630, 1988.

WELCH, R. A. RTX Toxin structure and function: A story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 257, p. 85-111, 2001.

WELINDER-OLSSON, C.; KAIJSER, B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 37, p. 405-416, 2005.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exper. Mol. Pathol.** v. 85, p. 11- 19, 2008.



WU, X. Y.; CHAPMAN, T.; TROTT, D. J.; BETTELHEIM, K.; DO, T. N.; DRIESEN, S.; WALKER, M. J.; CHIN, J. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 83-91, 2007.

YAN, F.; POLK, D. B. Commensal bacteria in the gut: learn who our friends are. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 20, p. 565- 571, 2004.

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; LIESEGANG, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, H.; BITZAN, M.; KARCH, H. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin- producing *Escherichia coli* O26 strains. **J. clin Microbiol.**, v. 38, p. 2134-2140, 2000.