



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATHELIN MELO E SILVA LASCOWSKI

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO**

Londrina
2007

KATHELIN MELO E SILVA LASCOWSKI

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta S. Pelayo

Londrina
2007

KATHELIN MELO E SILVA LASCOWSKI

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO**

BANCA EXAMINADORA

Emerson J. Venâncio

Halha O. Saridakis

Jacinta S. Pelayo

Londrina, 01 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Erine Carlos Lascowski e Eliana M E S Lascowski, pelo amor incondicional e incentivo durante toda minha vida.

À minha irmã, Karin M E S Lascowski, pelo amor e companheirismo sempre.

A minha orientadora Jacinta Sanchez Pelayo, por sua ajuda, amizade, ensinamentos e por me apresentar à microbiologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização desse trabalho, em especial:

Aos meus pais, Erine C. Lascowski e Eliana M. E. S. Lascowski, e irmã, Karin M. E. S. Lascowski, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

A minha Orientadora e Amiga, Jacinta Sanchez Pelayo, pela orientação, estímulo na minha iniciação científica, por me ensinar tudo que sei na área microbiológica e pelo apoio durante a graduação e mestrado.

A minha equipe de trabalho Ligia Maira Rogeri dos Santos, Maria Rachel Penna Firme Brito, Ilmara Varotto, Juliana Rezende e Silvia Cestari pela amizade, companheirismo e colaboração nos experimentos.

A professora Halha O. Saridakis, pelos ensinamentos, sugestões e por participar das minhas bancas relacionadas à graduação e pós-graduação.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Microbiologia, por compartilharem seus conhecimentos.

Ao secretário da Pós-graduação em microbiologia, Alex, e a secretária do departamento de Microbiologia, Nalva, por sempre serem gentis e prestativos.

Aos funcionários da UEL, pela ajuda principalmente na organização e limpeza dos materiais utilizados para realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Secretaria Estadual da Saúde/PR pelo subsídio.

A colega de mestrado Mariana C. Minari, pela contribuição e fornecimento das células HEp-2 sempre lindas.

Aos meus irmãos de coração, Juliana Terssariol e Paulo Correa, por me tolerar, ajudar, aconselhar e estimular em todos os momentos.

Aos companheiros de laboratório, Alessandra Nimtz, Ariane Bertão, Carlos Alfredo Salci Queiroz, Cláudia Ross, Eduardo Feniman, Eliana Vepero, Ilmara Varotto, Juliana Rezende Vasconcelos, Juliana Terssariol, Karen Bauab, Ligia Maira Rogeri dos Santos, Maria Rachel Pena Firme Brito, Paula Inês Pilar Lemos Barbosa, Tatiane Yuis, Michele Siewert, Rafael Osti de Melo, Rafael Penha, Raquel Girardello e Silvia Cestari, pelas festas, churrascos, Happy Hours e infindáveis risadas.

Aos meus amigos especiais, Luis Gustavo Morello, Juliana Merlin, Camila Moreira, Alexandre Saito, Alexandre Sasaki, César Luis Laguna, Suzy Chang, Beatriz Toschi, Maria Carolina Feitosa, Fernanda Sanches e Ana Larissa Piacentini, onde, cada um à sua maneira, às vezes perto, muitas vezes longe, mas sempre presentes no meu coração me dando força, estímulo, carinho, amor e amizade, sem me esquecer das farras, é claro.

Ao meu sobrinho Pedro Lascowski Laguna por me divertir, alegrar e ensinar muito, apesar de seus oito meses de idade.

A todos, o meu sincero e de coração

Muito Obrigada!!!

*“Tudo Posso Naquele que me Fortalece”
Filipenses 4:13*

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens, que eu falasse a língua dos anjos,
sem amor eu nada seria...”*

I Coríntios 13

“Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca que prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo.

Impossível não é um fato é uma opinião!

Impossível não é uma declaração é um desafio!

Impossível é hipotético!

Impossível é temporário!

Impossível é nada!”

Mohamed ALI

*“Volta teu rosto sempre na direção do Sol,
e então, todas as sombras ficarão para trás.”*

Provérbio Chinês

LASCOWSKI, Kathelin Melo e Silva. **Caracterização genotípica e fenotípica de fatores de virulência de *Escherichia Coli* diarreiogênica isoladas de água para consumo humano**. 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi detectar a presença de cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) em 300 cepas de *E. coli* isoladas de 209 amostras de água para consumo humano. Nenhuma cepa foi classificada como EPEC. Doze cepas de diferentes amostras de água foram classificadas como STEC e apresentaram os genes *stx1* e/ou *stx2*, *saa* e *hlyA*. Nenhuma cepa apresentou o gene *eae*. Todas cepas *stx* positivas apresentaram efeito citotóxico em células Vero. As 12 cepas positivas para *hlyA*, expressaram enterohemolisina em ágar sangue. Quanto à adesão em células HEP-2, o padrão característico descrito para STEC, adesão semilocalizada, foi encontrado somente em 4 cepas, apesar das 12 apresentarem o gene *saa*, responsável por esse modelo de adesão. Sete cepas apresentaram padrão de adesão agregativo e uma o padrão *chain-like adherence*. Das cepas pesquisadas, 75 pertencem ao patótipo ETEC, sendo que dessas, duas possuem LT-II (Toxina Termolábil) e STa (Toxina Termoestável), 22 possuem apenas STa e 51 apenas LT-II. Também verificou-se a presença do gene para a toxina EAST1 em 8 cepas. Futuramente será realizada a sorotipagem e classificação das variáveis de *stx2*. Assim, podemos concluir que a presença dessas bactérias na água para consumo humano pode causar sérios problemas para a saúde da população, tendo em vista as implicações que a presença de *E. coli* diarreiogênica pode trazer à saúde do homem. Um melhor controle da água fornecida à população, através da Rede pública, deve ser priorizado.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Virulência (Microbiologia). Água - Controle de qualidade.

LASCOWSKI, Kathelin Melo e Silva. **Caracterização genotípica e fenotípica de fatores de virulência de *Escherichia Coli* diarreiogênica isoladas de água para consumo humano**. 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in 300 strains of *E. coli* isolated from 209 samples of water for human consumption. Twelve strains from different samples of water were classified as STEC and contained the genes *stx1* and/or *stx2*, *saa* and *hlyA*. None of the strains showed the presence of the *eae* gene. All *stx*- positive strains showed cytotoxicity in Vero cells. The 12 strains positive for *hlyA* expressed enterohemolysin on blood agar. With respect to adhesion in Hep-2 cells, semilocalized adherence, the characteristic pattern described for STEC, was found only in 4 strains, despite that 12 showed the *saa* gene, which is responsible for this type of adhesion. Seven strains showed the aggregative adherence pattern and one the *chain-like adherence* pattern. Future studies will be carried out to serotype and classify the *stx2* variables. It will also be important to determine if these strains show the LEE region since the *saa* gene is only present in LEE-negative STEC. Thus, we conclude that the presence of these bacteria in water for human consumption can cause serious public health problems.

Keywords: *Escherichia coli*. Virulence (Microbiology). Water - Quality control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
REFERÊNCIAS	20
SHIGA TOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN SAMPLES OF DRINKING WATER DISTRIBUTION SYSTEM	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIALS AND METHODS	28
RESULTS	32
DISCUSSION	34
ACKNOWLEDGMENTS	36
REFERENCES	36
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMAN	42
RESUMO	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	48
AGRADECIMENTOS	49
REFERÊNCIAS	50
4 CONCLUSÃO	56

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli, microrganismo que faz parte da microbiota intestinal humana, proporciona benefícios para seus hospedeiros (DRASAR; HILL, 1994). Entretanto, algumas cepas dessa espécie podem causar infecções no sistema urinário, no sistema nervoso central, sepse e gastroenterites. Representa um dos principais agentes causais de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e estão agrupadas em seis categorias, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O: H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Esses grupos de *E. coli* diarreiogênicas são classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, torna-se evidente que algumas categorias incluem microrganismos bastante diferentes. Desta forma, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER et al., 2004).

A infecção por STEC, pode resultar em casos esporádicos de diarreia, colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), constituindo-se em um dos principais causadores de insuficiência renal, na forma aguda ou crônica (LEOTTA et al., 2005).

Cepas de STEC podem produzir um ou ambos os tipos de toxina Shiga, designadas Stx1 e Stx2, a última intimamente relacionada à SHU. Algumas cepas de STEC, caracterizadas como EHEC, também têm a capacidade de produzir a lesão histopatológica conhecida como *attaching and effacement (A/E)* na mucosa intestinal, uma propriedade codificada por genes presentes na ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima

da bactéria à membrana apical da célula epitelial e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais (MOON et al., 1983).

Os genes que fazem parte da ilha de patogenicidade LEE estão organizados em cinco regiões principais de funções conhecidas: LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4, LEE 5 (MELLIES et al., 1999; SANCHES-SANMARTIN et al., 2001). A região LEE 5 contém os genes *eae*, que codifica a adesina intimina e *tir* (translocated intimin receptor), que codifica o receptor da intimina (Tir), o qual é translocado para a célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III. As regiões LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm os genes que codificam o sistema de secreção tipo III e LEE 4 os genes que codificam várias proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo III (KAPER et al., 2004).

Alguns genes da região LEE são regulados por *quorum sensing*, e induzem a formação de biofilme e a síntese de adesinas e flagelos (SIRCILI et al., 2004). Orndorff et al. (2004) afirmam que componentes do intestino humano, como o ácido colônico, proporcionam o desencadeamento da formação de biofilme por *E. coli*.

A maioria das cepas STEC isoladas de humanos, produzem enterohemolisinas que apresentam efeito citotóxico sobre vários tipos de células, adesinas fimbriais e afimbriais codificadas por plasmídios (PATON; PATON, 2002).

Paton et al. (2001) descreveram o gene designado *saa*, presente em um plasmídio a princípio encontrado em STEC LEE-negativa, responsável pela síntese de uma proteína adesina autoaglutinante a qual confere uma adesão semi-localizada. Outra fímbria encontrada em STEC LEE negativa e em STEC LEE positiva, é a fímbria longa polar (LPF), uma fímbria do tipo 1 primeiramente encontrada em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Foi demonstrado que essa fímbria facilita a adesão primária da bactéria à célula intestinal (DOUGHTY et al., 2002).

Dentro do grupo de *E. coli*, que causam a lesão A/E e portadoras da região LEE, também encontram-se ainda as EPEC típicas e atípicas. O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para caracterizar amostras de *E. coli* que diferiam das EPEC típicas por não apresentarem o plasmídio EAF (EPEC adherence factor) e das EHEC, por não produzirem a toxina Shiga (KAPER, 1996). O plasmídio EAF contém os genes envolvidos com a síntese de uma

adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além da seqüência genética referente ao fragmento da sonda EAF e do operon *per* (plasmid encoded regulator), o qual codifica genes reguladores de fatores de virulência de EPEC. Tanto EPEC típica como a atípica são capazes de formar a lesão A/E (TRABULSI et al., 2002).

Até o momento não foi descrito qualquer fator de virulência exclusivo de EPEC atípica que pudesse servir para definir este microrganismo como uma categoria de *E. coli* diarreio gênica. Ao contrário, todos os fatores de virulência encontrados têm sido comuns a outras categorias de *E. coli* diarreio gênicas. As EPEC atípicas secretam Tir e as proteínas Esp A, B, D e F. Em algumas amostras, Tir assemelha-se mais à Tir de EHEC e em outras, à Tir de EPEC. Nos últimos anos foram descritas várias adesinas e toxinas em EAEC, STEC e EPEC típica que ainda não foram pesquisadas em EPEC atípica, como LPF, *pilus* do tipo IV (*pil*), adesina fimbrial *sfpA*, adesina auto-aglutinante (*saa*), dispersina entre outros (KAPER et al., 2004).

São considerados reservatórios de *E. coli*, bovinos, eqüinos, cães, pássaros e mosquitos em geral, e também, a água (HANCOCK et al., 1998). Acredita-se que a ampla disseminação de *E. coli* no meio ambiente representa a ligação entre a contaminação de água e alimentos, com infecções desse patógeno no homem (RASMUSSEN; CASEY, 2001).

No Brasil, amostras pertencentes ao sorotipo O157:H7, as quais fazem parte do grupo EHEC, foram isoladas no Rio de Janeiro a partir de amostras de fezes de bezerros, por Cerqueira et al. (1999). Esses mesmos autores verificaram alta prevalência de amostras de STEC isoladas tanto de produtos cárneos de origem bovina, como de fezes de bovinos (CERQUEIRA et al., 1997; CERQUEIRA et al., 1999).

Em Londrina-Pr, Ludovico et al. (2000) pesquisando toxinas em *E. coli* isoladas de amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia, encontraram alta porcentagem de cepas de STEC. Esses resultados sugerem que o grupo de STEC venha a se tornar um importante agente emergente no Brasil e que os bovinos podem ser o reservatório de cepas de STEC entre elas a EHEC, envolvidas em doenças humanas (WIELER et al., 1996).

É provável que a baixa incidência de STEC em humanos no Brasil, se deva à elevada prevalência de EPEC (NUNES et al., 2003). Infecções

causadas por EPEC na infância, podem conferir resposta imune cruzada contra STEC que carregam antígenos em comum com EPEC, como o LPS e intimina (BEUTIN et al., 1998; NUNES et al., 2003).

Segundo Menezes et al. (2003), ETEC, conhecida por causar a diarreia do viajante, é responsável por cerca de 20% dos casos de diarreia em crianças, no Brasil. A habilidade desse microrganismo em colonizar o epitélio intestinal é favorecido por fatores de colonização produzidos por esse patótipo. Além do que, a produção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), contribui para perda de fluidos intestinais.

EAEC é definida como o patótipo de *E. coli* que adere a células epiteliais em um padrão denominado adesão agregativa (AA) (NATARO et al., 1987). O termo AA foi estabelecido para definir o padrão de adesão em células HEp-2 de amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile (NATARO et al., 1987). No padrão AA as bactérias podem aderir à superfície das células HEp-2, e também à superfície da lamínula, numa configuração que lembra tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos ou ainda distribuindo-se em forma de cordões (NATARO et al., 1987; GIOPPO et al., 2000). A primeira toxina isolada de EAEC, EAST1, é uma enterotoxina codificada por genes plasmidiais e apresenta homologia com a STa de ETEC. Entretanto, EAST1, não está presente somente em EAEC, mas está distribuída entre outras *E. coli* patogênicas e não patogênicas (ZHOU et al., 2002).

Sakazaki et al. (1967), isolaram e identificaram EIEC, caracterizadas por causarem doença disentérica e por se comportarem como *Shigella*, não somente na patogênese (com invasão e multiplicação da bactéria nos enterócitos), mas também no comportamento bioquímico (incapacidade de descarboxilar a lisina e ausência de flagelo) e no teste de Séreny, provocando ceratoconjuntivite em cobaias ou invasão no teste em células HeLa (ROBINS-BROWNE, 1987).

Outra categoria de *E. coli* diarreio gênica é conhecida com DAEC e pode ser identificada inicialmente pelo modelo de adesão em células. DAEC é definida como a categoria de *E. coli* diarreio gênica que adere a células epiteliais, cultivadas *in vitro*, de forma difusa (AD) sobre toda a superfície celular (SCALETSKY et al., 1984). A adesão destas bactérias pode ser mediada por dois

tipos de adesinas, sendo uma fimbrial (F1845) e outra afimbrial (AIDA-I) (BILGE et al., 1989; BENZ; SCHIMIDT, 1992). Entretanto, o mecanismo de patogenicidade desses microrganismos permanece pouco elucidado (NATARO; KAPER, 1998).

Tomando-se por base os mecanismos de virulência, os tipos de interação com linhagens celulares, sorotipos, características clínicas e aspectos epidemiológicos, as amostras de *E. coli* diarreioagênica podem ser classificadas em pelo menos sete categorias, como demonstrado na Tabela 1 (ROBINS-BROWNE, 1987; KAPER, 1996; NATARO; KAPER, 1998).

Tabela 1 – Principais características de *E. coli* diarreioagênicas

Grupos	Características Principais^a
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	enterotoxinas LT e/ou ST
<i>E. coli</i> enteroinvasora	plasmídio INV (invasão)
<i>E. coli</i> enteropatogênica	plasmídio EAF, gene <i>bfp</i> , <i>eae</i>
<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica	gene <i>eae</i>
<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga/EHEC)	gene <i>eae</i> , <i>hlyA</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> ,
<i>E. coli</i> enteroagregativa	adesão agregativa em cultura de células
<i>E. coli</i> que adere difusamente	adesão difusa em cultura de células

^a EAF (EPEC adherence factor); *bfp* (bundle-forming pilus); *eae* (EPEC attaching effacing); LT (enterotoxina termolábel); ST (enterotoxina termoestável); *stx1* e 2 (toxina Shiga 1 e 2), *hlyA*; enterohemolisina.

Desde os primeiros estudos da microbiologias, a detecção de bactérias de origem fecal é utilizada para o controle da qualidade da água destinada ao consumo humano (ASHBOLT, 2004) e o monitoramento regular das fontes de água é essencial para manter a qualidade do serviço de abastecimento de água (LISLE et al. 1999).

E. coli é um dos microrganismos utilizados como parâmetro de controle da qualidade da água para consumo, tendo em vista que é considerado um indicador de contaminação fecal e também devido a todas as implicações que a presença desse microrganismo pode causar à saúde do homem (FARNLEITNER et al., 2000).

O Decreto nº. 5.440, de 4 de maio de 2005 (BRASIL), determina que *E. coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal, e de eventual presença de organismos patogênicos; e que, a água para consumo humano, não deve obrigatoriamente apresentar coliformes fecais. Cabe a cada

município o tratamento da água, o controle microbiológico e físico-químico para o consumo de sua população.

Numerosos surtos de doenças, devido à contaminação da água de rede municipal com microrganismos, como *E. coli*, vem sendo reportados no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (MACKENZIE et al., 2004).

A presença de *E. coli* na água constitui uma preocupação significativa para saúde pública, desde que a transmissão de fatores de virulência entre cepas de *E. coli* contribui para sua patogenicidade, e aumenta sua diversidade no ambiente (DONNENBERG; WHITTHAN., 2001). Fontes de água são consideradas reservatórios potenciais de *E. coli* (GARCÍA – ALJARO et al. 2005).

Existem vários métodos qualitativos e quantitativos para detectar a presença de *E. coli* na água, dentre eles métodos colorimétricos e da reação em cadeia da polimerase (PCR) (FARNLEITNER et al., 2000).

Apoitia et al. (2004) constataram que 15% das águas subterrâneas de Cuiabá (BR) estão contaminadas com *E. coli*. Conte et al. (2003) avaliaram microbiologicamente as águas tratadas e não tratadas da região nordeste do estado de Rio de Janeiro (BR), e verificaram que 25% de todas amostras analisadas estão contaminadas com *E. coli*. Higgins et al. (2005) detectaram a presença de cepas de *E. coli tir* e *stx* positivas isoladas de água da região metropolitana de Baltimore (EUA).

Estudos de fatores de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de água potável, e o controle microbiológico da água fornecida à população, são importantes na prevenção de surtos de infecções relacionados à água do sistema de abastecimento público (DONNENBERG; WHITTHAN., 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância das diarreias causadas por *E. coli* em nosso meio e tendo em vista a importância da detecção de agentes emergentes e reemergentes, vimos a necessidade de um estudo epidemiológico avaliando a presença de STEC, EPEC, ETEC e EAEC em amostras de *E. coli*, isoladas de água para consumo humano pertencente aos municípios da 17ª e 18ª regionais de Saúde no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detecção de genes associados a fatores de virulência de EPEC, STEC, ETEC e EAEC através da PCR.
- Expressão dos genes *stx1* e *stx2*, utilizando cultura de células Vero.
- Caracterização do padrão de adesão em cultura de células HEp-2.
- Detecção de hemolisinas em placas de ágar sangue de carneiro a 5%.

REFERÊNCIAS

APOITIA, L. F. M., ROSA-FILHO, E. F., BITTENCOURT, A. V. L., HINDY, E. (2004) Caracterização preliminar da qualidade das águas subterrâneas na cidade de Cuiabá-MT. **Bo Par. Geoc** 54, 7-17.

ASHBOLT, N. J. (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicol** 98, 229–238.

BENZ, I., SCHMIDT, M. (1992) AIDA-I, the adhesion involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Mol Microbiol** 6, 1539-1546.

BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. (1998) Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Zentralbl Bakt Hyg** 267, 576-588.

BILGE, S. S., CLAUSEN, C. R., LAU, W., MOSELEY, S. L. (1989) Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845 mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **J Bacteriol** 171, 4281-4289.

BRASIL. Decreto nº. 5.440, de 4 de maio de 2005. Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano.. D. Oficial da Rep. Feder. Do Brasil. Brasília, 4 de maio de 2005; 184º da Independência e 117º da República.

CERQUEIRA, A. M. F., TIBANA, A., GUTH, B. E. C. (1997) High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **J Food Prot** 60, 177-180.

CERQUEIRA, A. M. F., GUTH, B. E. C., JOAQUIM, R. M., ANDRADE, J. R. C. (1999) High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet Microbiol** 70, 111-121.

CONTE, V. D., COLOMBO, M., ZANROZZO, A. V., SALVADOR, M. (2003) Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas da região nordeste do Estado de Tio de Janeiro – BR. **Ciênc Tecnol Aliment** 23, 190-194.

DONNENBERG, M. S., WHITTHAN, T. S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Investig** 107, 539–548.

DOUGHTY, S., SLOAN, J., BENNETT-WOOD, V., ROBERTSON, M., ROBINS-BROWNE, R. M., HARTLAND, E. L. (2002) Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun** 12, 6761-6769.

DRASAR, B. S., HILL, M. J. (1994) Human intestinal flora. London. **Un Kingdom-Academic Press Ltd** 7, 36–43.

FARNLEITNER, A. H. KREUZINGER, N., GRILLENBERGER, S., KAVKA, G. G., RATH, J., MACH, R. L. (2000) Simultaneous Detection and Differentiation of *Escherichia coli* Populations from Environmental Freshwaters by Means of Sequence Variations in a Fragment of the b-D-Glucuronidase Gene. **Appl Environ Microbiol** 66, 1340–1346.

GARCÍA-ALJARO, C., MUNIESA, M., BLANCO, J. E., BLANCO, M., BLANCO, J., JOFRE, J. and BLANCH, A. R. (2005) Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Aquatic Environments. **Fems Microbiol Lett** 246, 55-65.

GIOPPO, N. M. R., ELIAS, W. P., VIDOTTO, M. C, LINHARES, R. E., SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A. T., TRABULSI, L. R., PELAYO, J. S. (2000) Prevalence of HEp-2 cell- adherence *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolate from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett** 147, 293-98.

HANCOCK, D., BESSER, T., RICE, D., EBEL, D., HERRIOTT, D., CARPENTER, L. (1998) Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. **Prev Vet Med** 35, 11–19.

HIGGINS, J. A., BELT, K. T., KARNS, J. J. S., RUSSELL-ANELLI, J., SHELTON, D. R. (2005) tir- and stx-Positive *Escherichia coli* in Stream Waters in a Metropolitan Area. **Appl Environ Microbiol** 5, 2511–2519.

KAPER, J. B. (1996) Defining enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev Microbiol** 27, 130–133.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. **N Rev Microbiol** 2, 123-138.

LEOTTA, G. A., CHINEN, I., EPSZTEYN, S., MILIWEBSKY, E., MELAMED, I. C., MOTTER, M., FERRER, M., MAREY, E., RIVAS, M. (2005) Validación de una Técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Rev Argent Microbiol** 37, 1-10.

LISLE, J. T., PHYLE, B. H., MCFETERS, G. A. (1999) The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol** 29, 42-47.

LUDOVICO, M. S. (2000) Prevalência de *E. coli* produtora de shiga toxina (stec) e *E. coli* attaching/effacing (aeec) em isolados de bezerros na região norte do Paraná, Dissertação (Mestrado em Farmácia Bioquímica) - Universidade Estadual de Londrina, Orientador: Halha Ostrensky Saridakis.

MACKENZIE, W. R., HOXIE, N. J., PROCTOR, M., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A.; PETERSON, D. R., ADDISS, J. J., FOX, K. R., ROSE, J. B., DAVIS, J. P. (2004) A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidiosis infection transmitted through a public water supply. **N Eng J Med** 331, 161-167.

MELLIES, J. L., ELLIOT, S. J., SPERANDIO, V., DONNENBERG, M. S., KAPER, J. B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol Microbiol** 33, 296-306.

MENEZES, C. A., GONÇALVES, D. S., AMIANTI, J., FERNANDES, I., TADDEI, C. R., KOGA, P. C., TRABULSI, L. R., MARTINEZ, M. B. PIAZZA, R. M. F. (2003) Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigênica *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz J Microbiol** 34, 11-13.

MOON, H. W., WHIPP, S. C., ARGENZIO, R. A., LEVINE, M. M., GIANNELA, R. A. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect Immun** 41, 1340-1351.

NATARO, J. P., KAPER, J. B., ROBINS-BROWNE, R., PRADO, V., VIAL, P. A., LEVINE, M. M. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J** 16, 829-831.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** 11, 142-201.

NUNES, E. B., SARIDAKIS, H.O., IRINO, K., PELAYO, J.S. (2003) Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhea in Londrina, Brazil. **J Med Microbiol** 52, 499-504.

ORNDORFF, P. E., DEVAPALI, A., PALESTRANT, S., WYSE, A., EVERETT, M. L., BOLLINGER, R. R., PARKER, W. (2004) Immunoglobulin-Mediated Agglutination of and Biofilm Formation by *Escherichia coli* K-12 Require the Type 1 Pilus Fiber. **Infect Immun** 4, 1929-1938.

PATON, A. W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M. C., PATON, J. C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement- negative Shiga toxinogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect Immun** 69, 6999-7009.

PATON, J. C., PATON, A. W. (2002) Direct Detection and Characterization of Shiga Toxinogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. **J Clin Microbiol** 01, 271-274.

RASMUSSEN, M., CASEY, T. (2001) Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. **Crit Rev Microbiol** 27, 57-73.

ROBINS-BROWNE, R. M.. (1987) Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev Infect Dis** 9, 28-53.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; SAITO, M. (1967) Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. **Jpn J Med Sci Biol** 20, 387-99.

SANCHEZ-SANMARTIN, C., BUSTAMANTE, V. H., CALVA, E., PUENTE, J. L. (2001) Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 183, 2823-2833.

SIRCILI, M. P., WALTERS, M., TRABULSI, L. R., SPERANDIO, V. (2004) Modulation of EPEC virulence by quorum sensing. **Infect Immun** 4, 2329-2337.

SCALETSKY, I. C. A . SILVA, M. L. M. TRABULSI, L. R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun** 45, 534- 536.

TRABULSI, L. R., KELLER, R., GOMES, T. A. T. (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis** 8, 508-513.

WIELER, L. H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRUCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. (1996) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: Association of adhesion with carriage of eae and other genes. **J Clin Microbiol** 34, 2980-2984.

ZHOU Z, OGASAWARA J, NISHIKAWA Y. (2002) An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). **Epidemiol Infect** 128, 363–371.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in samples of drinking water distribution system

K. M. E. S. Lascowski¹ and J. S. Pelayo¹

¹Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

Abbreviated running title: STEC in water for human consumption

Correspondence to: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, University Estadual de Londrina (UEL), Cx. P. 6001, 86051-970, Fax: +55 43 3371-4788, Londrina, PR, Brazil (e-mail: jspelayo@sercomtel.com.br).

Abstract

The aim of this study was to detect the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in 300 strains of *E. coli* isolated from 209 samples of water for human consumption. Twelve strains from different samples of water were classified as STEC and contained the genes *stx1* and/or *stx2*, *saa* and *hlyA*. None of the strains showed the presence of the *eae* gene. All *stx*-positive strains showed cytotoxicity in Vero cells. The 12 strains positive for *hlyA* expressed enterohemolysin on blood agar. With respect to adhesion in Hep-2 cells, semilocalized adherence, the characteristic pattern described for STEC, was found only in 4 strains, despite that 12 showed the *saa* gene, which is responsible for this type of adhesion. Seven strains showed the aggregative adherence pattern and one the chain-like adherence pattern. Future studies will be carried out to serotype and classify the *stx2* variables. It will also be important to determine if these strains show the LEE region since the *saa* gene is only present in LEE-negative STEC. Thus, we conclude that the presence of these bacteria in water for human consumption can cause serious public health problems.

Keywords: Water. *Escherichia coli*. Shiga toxin. Hemolysin. Adhesion.

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are important pathogens associated with a vast spectrum of infection in humans, from moderate diarrhea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) (Vaz et al. 2006). STEC can survive for long periods in the soil, corrals, pastures and also in water (Beutin et al. 2004). The transmission of this pathogen occurs through poorly cooked meat, non-pasteurized milk, and vegetables and water contaminated with the feces of carriers (García – Aljaro et al. 2005). The presence of *E. coli* in water is a significant concern for public health (Maldonado et al. 2005).

Various virulence factors involved in the pathogenicity of STEC have already been described (Nataro and Kaper 1998). Shiga toxin (Stx) is the main virulence factor in STEC strains, which is known to consist of two distinct forms with similar biological activity but different immunogenicity (Friederich et al. 2002). The sequence of *stx1* is highly conserved, while *stx2* possesses 11 variants (Brett et al. 2003). Intimin, another virulence found in STEC (principally in enterohemorrhagic *E. coli*), encoded by the chromosomal gene *eae* is responsible for an intimate adherence of the bacteria to enterocytes, causing attaching and effacing lesions (Nataro and Kaper 1998), while some STEC strains involved in serious diseases do not carry this gene (Paton et al. 1999). Another virulence factor, hemolysin, belongs to different pathotypes of *E. coli* which have been previously described (Beutin et al. 1991). Many STEC strains produce a hemolysin called enterohemolysin, encoded by the gene *hlyA* (Paton and Paton 1998).

The majority of STEC strains have large plasmids that code for proteins that function as hemolysins, proteases and adhesins, such as the STEC

autoagglutinating adhesion (encoded by the *saa* gene). The *saa* –carrying plasmid is found in STEC that do not possess the LEE (*locus enterocyte effacement*) region. This adhesin which is an outer membrane protein accounts for the semilocalized adherence (SLA) pattern in HEp-2 cells (Paton and Paton 2002).

Reports in the literature of the isolation of environmental strains of STEC are less frequent, due to the small number of these pathogens compared to those found in mammals, also due to the scarcity of investigations on this pathogen in samples of environmental origin (Chalmers et al. 2000).

Thus, the aim of this study was to determine the presence of STEC in 300 strains of *E. coli* isolated from 209 samples of water for human consumption in the north region of Paraná, Brazil.

MATERIALS and METHODS

Samples

During the period of February of 2005 to January of 2006, 196 samples of water *in natura* and 13 samples of treated water were collected for study in 27 municipalities in the north of Paraná State, Brazil. The detection of coliforms and *E. coli*, using the Colilert (Quanti-Tray/2002™) method (IDEXX Laboratories, represented by SOVEREIGN - BR), was performed according to the manufacturer's instructions, approved by the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2004) and by the Portaria do Ministerio da Saúde no. 518 (BRASIL, 2004).

Isolation of target bacteria

Quanti-Trays that displayed yellow-fluorescent wells (ONPG-positive, MUG-positive) were selected to recover the *E. coli*. Target organisms were recovered as

described with modifications (Pisciotta et al. 2002) using a sterile syringe to pierce the backing material after the surface was wiped with 70% alcohol. Liquid from some sampled yellow-fluorescent wells was streaked onto MacConkey agar (MC) (Biobras, MG, Brazil). Two to four lactose-fermenting colonies and one non-fermenting colony were picked randomly from each MC plate, and then identified biochemically using the following media: EPM (Toledo et al.1982a), MILi (Toledo et al. 1982b) and Simon's citrate (Biobras, MG, Brazil). A total of 300 isolates of *E. coli* were obtained. The strains were stored in brain heart infusion broth (BHI) (Difco, Michigan, USA) with 20% glycerin at -70°C until use.

Bacterial strains used as positive controls in this study are listed in Table 1. Strain HB101 (*E. coli* K-12) (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969) was used as the negative control in all tests.

Table 1 – Bacterial strains used as positive controls in this study.

Strain	Serotype	Origin	Virulence genes	Reference
EDL933	O157:H7	Human	<i>stx1, stx2, eae, hlyA</i>	Yu and Kaper (1992)
98NK2	O113:H21	Human	<i>saa</i>	Paton <i>et al.</i> (2001)
O42	O44:H18	Human	<i>aafA, astA</i>	Nataro <i>et al.</i> (1995)
E2348/69	O127:H6	Human	<i>eae, bfp</i>	Jerse <i>et al.</i> (1990)

Detection of virulence genes by PCR

All 300 *E. coli* isolates were screened for the presence of sequences of *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *eae* and *saa*. Table 2 shows the primer sequences, sizes of amplified DNA fragments and references for all sequences studied. Amplification reactions were performed as follows: Luria-Bertani agar (LB) cultures were suspended in 300 µL Milli-Q water (Millipore) and boiled for 10 min to release and denature the bacterial DNA. Amplification of bacterial DNA was carried out in a volume of 25 µL,

containing 10 μ L bacterial lysate, 200 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol each primer and 1.5 U *Taq* DNA polymerase (all Gibco-BRL). After amplifications, the products were electrophoresed in 2% agarose gels (Difco, Michigan, USA), stained with ethidium bromide (Gibco-BRL) and visualized using UV light.

Table 2 – Sequences, sizes of amplified DNA fragments and respective references for primers used in this study.

Target	Primer sequence (5'→3')	Amplified fragment size (bp)	Reference
<i>stx1</i>	F*: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R**: AGAACGCCCCACTGAGATCATC	180	Jackson <i>et al.</i> 1987a
<i>stx2</i>	F: GGCACTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	Jackson <i>et al.</i> 1987b
<i>eae</i>	F:TCGTCACAGTTGCAGGCCTGGT R: CCGAAGTCTTATCAGCCGTAAGT	800	Louie <i>et al.</i> 1993
<i>hlyA</i>	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Schmidt <i>et al.</i> 1995
<i>saa</i>	F: CGTGATGAACAGGCTATTGC R: ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	Paton <i>et al.</i> 2001

*F, Forward; **R; Reverse

HEp-2 cell adherence assay

All 300 *E. coli* isolates were tested for adherence to HEp-2 cells as described previously (Cravioto *et al.* 1979). When the adherence pattern was not defined after 3 h incubation, the test was repeated using a 6 h incubation period.

Hemolysin assay

All strains were tested for hemolysin production as described elsewhere (Beutin *et al.* 1991). The strains were cultivated on blood agar (Difco, Michigan, USA), supplemented with 10 mM CaCl₂ and 5 % defibrinated sheep erythrocytes that had been washed three times in PBS (phosphate buffered saline). Plates were examined for hemolysis zones around bacterial growth after 3 h (alpha-hemolysin) and 24 h (enterohemolysin) incubation at 37° C.

Cytotoxicity assay

Strains tested

Tested for cytotoxicity were 12 strains of *E. coli* that had the genes *stx1* and/or *stx2* and the positive (Table 1) and negative control strains.

Preparation of toxin

The toxin was prepared as described previously (Robert et al. 2001).

Methods

Cytotoxicity was determined as described previously (Robert et al. 2001) with some modifications. Vero cells were exposed to the bacterial filtrate diluted 1:4, 1:40, 1:400 and 1:4000 in DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, São Paulo, BR). A 100 µL aliquot of these dilutions was tested in 96-well plates in triplicate.

After exposure to the bacterial filtrate, metabolically active cells were determined using an MTT diagnostic kit (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Roche Diagnostics, Indianapolis). After 24 h incubation, the supernatant of each well was aspirated and the wells were washed with DMEM, utilizing the reagent and specifications of the manufacturer. The plate was maintained at room temperature for 3 h and with agitation for another 30 min. After this period, absorbance (A) was read at 490nm and 630nm using an ELISA plate reader (Bio-Rad). The percent cytotoxicity was determined in the following manner: % cytotoxicity = (A of the sample – A of the negative control) / (A of the positive control – A of the negative control) x 100.

The cytotoxicity assay described earlier by Konowalchuk et al. (1977) was also carried out concomitantly, using the same strains mentioned above.

RESULTS

Detection of virulence factors by PCR

Of the 300 strains studied, 12 had the *stx* gene, all of which were isolated from different samples of water from 9 municipalities (Table 3). Strains 2 and 3 were isolated from one municipality and strains 10, 109 and 167 were isolated from another. The 12 strains positive for *stx*, also showed the presence of the *hlyA* and *saa* genes. The other 288 strains studied, did not show the presence of the *hlyA* gene, and only one was positive for *saa*, which was the only gene detected in this latter strain. None of the 300 strains showed the presence of the *eae* gene.

Table 3 – Genotypic profile of the strains positive for Shiga toxin.

Strain number	Genotypic profile				
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>
2	+	-	-	+	+
3	+	-	-	+	+
10	+	+	-	+	+
22	-	+	-	+	+
63	+	+	-	+	+
89	+	+	-	+	+
109	+	+	-	+	+
134	+	+	-	+	+
167	-	+	-	+	+
204	-	+	-	+	+
258	-	+	-	+	+
281	-	+	-	+	+

Cytotoxicity assay

In the MTT cytotoxicity assay, the result was obtained from the means of triplicate readings at 490 and 630nm, as specified in the kit. The percentage of cytotoxicity for the dilutions tested is shown in Table 4. A percentage greater than 50% signifies a high cytotoxic effect and less than 50% represents a low cytotoxic effect.

Table 4 – Percent cytotoxicity for Shiga toxin in Vero cells determined by MTT assay.

Dilution	Strain number														
	2	3	10	22	63	89	109	134	167	204	258	281	Stx1/2	HB 101	DMEM
1:4	87 %	73 %	78 %	85 %	58 %	82 %	81 %	78 %	80 %	76 %	57 %	64 %	100%	0%	0%
1:40	55 %	45 %	50 %	54 %	43 %	52 %	53 %	50 %	50 %	50 %	42 %	44 %	56%	0%	1%
1:400	38 %	27 %	31 %	36 %	23 %	34 %	34 %	32 %	32 %	29 %	22 %	25 %	42%	1%	1%
1:4000	15 %	12 %	10 %	10 %	8% %	13 %	4% %	6% %	11 %	3% %	4% %	5% %	6% %	0% %	0% %

The cytotoxicity results obtained using the method of Konowalchuk et al. (1977) (see Table 5) were similar to those with the MTT assay.

Table 5 – Cytotoxic effect of Shiga toxin in Vero cells based on the method of Konowalchuk et al. (1977).

Dilution	Strain number ^a														
	2	3	10	22	63	89	109	134	167	204	258	281	Stx1/2	HB 101	DMEM
1:4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1:40	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	-	-
1:400	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	-	-	++	-	-
1:4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a +++: highly cytotoxic; ++ moderately cytotoxic; -: non cytotoxic

Hemolysis assay on blood agar

Of the 300 strains studied, the 12 that showed the presence of the *hlyA* gene, expressed enterohemolysin (Table 6), and only one strain expressed alpha-hemolysin, while the others did not show any hemolytic effect.

The adhesion test in HEp-2 cells

Of the 300 strains studied, 134 did not adhere to cells (including the strain that showed the presence of only the *saa* gene), while 151 strains caused aggregative adhesion (AA), with 4 of these showing strands between cells (CLA), 12 strains showing semilocalized adherence (SLA) and 3 producing diffuse adhesion.

Table 6 – Genotypic and phenotypic profiles of strains positive for Shiga toxin.

Strain number	PCR					Cytotoxicity in Vero cells	Hemolysis on blood agar	Adhesion in HEp-2 cells *
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>			
2	+	-	-	+	+	+	+	AA
3	+	-	-	+	+	+	+	SLA
10	+	+	-	+	+	+	+	AA
22	-	+	-	+	+	+	+	SLA
63	+	+	-	+	+	+	+	AA
89	+	+	-	+	+	+	+	CLA
109	+	+	-	+	+	+	+	AA
134	+	+	-	+	+	+	+	AA
167	-	+	-	+	+	+	+	AA
204	-	+	-	+	+	+	+	SLA
258	-	+	-	+	+	+	+	SLA
281	-	+	-	+	+	+	+	AA

*AA: aggregative adhesion; CLA: chain-like adherence; SLA: semilocalized adherence

DISCUSSION

Sources of water are considered potential reservoirs of *E. coli*, and various outbreaks of gastrointestinal infections and HUS have been associated with the contamination of water with *E. coli* (Maldonado et al. 2005; Chalmers, et al. 2000; Garcia–Aljaro et al. 2005).

The principal sources of contamination are: untreated wastewater that is released into rivers and lakes; landfills which affect ground water, and industries that utilize rivers to dump their toxic residues (García–Aljaro et al. 2005). The presence of *E. coli* in the distribution system of drinking water is a major problem for the health of the population (Blanch et al. 2006). In this work, 300 strains of *E. coli* isolated from water were studied, and 12 were classified as STEC. All 12 strains showed the presence of the genes *stx* (five had *stx1* and *stx2*, five only *stx2* and two only *stx1*), *saa* and *hlyA*. None of the 300 strains studied contained the *eae* gene. All strains that had the *stx1* and *stx2* genes showed a cytotoxic effect in Vero cells, which did not differ significantly whether the strains possessed only one or both of the toxins. All 12 strains showed cytotoxicity at 1:40 dilution, nine at 1:400 and

none at 1:4000. Siegler (2003) inoculated non-human primates with purified Stx1 and Stx2, and demonstrated that only those administered Stx2 developed HUS. It is important to point out that of the 12 strains that contained the *stx* gene, 10 showed the presence of the *stx2* gene.

The 12 strains positive for *hlyA* expressed enterohemolysis on blood agar and only one strain showed alpha - hemolysis, while the others did not demonstrate any hemolysis. Adhesion demonstrated in Hep-2 cells, the characteristic pattern described for STEC (SLA), was found only in 4 strains, despite that 12 strains showed the presence of the *saa* gene, responsible for this pattern of adhesion. According to Paton et al. (2001), this could be directly attributable to the shorter predicted Saa proteins or, alternatively, to poor expression of *saa* in these strains. All *saa*-positive strains were also positive for *hlyA*, suggesting that *saa* may also be plasmid- carried, a fact confirmed by the absence of *saa* in a derivative 98NK2 which had been cured of its large virulence plasmid (Paton et al. 2001). Seven other strains showed an AA adhesion pattern and one strain CLA as described in a sample of enteroaggregative E. coli (EAEC) and STEC (Gioppo et al. 2000; Lu et al. 2006). The next step in this work is to classify these strains according to their serotype and to determine which variables of *stx2* they show. Another important point is to determine if these strains show the LEE region since the *saa* gene is only present in LEE-negative STEC that also have the plasmid-carried *ehxA*, implying that *saa* is located on the respective large virulence plasmid (Paton et al. 2001).

Thus, we can conclude that the presence of these pathogenic bacteria in water for human consumption can pose risks to the health of the population and demonstrates faults in the water distribution system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CAPES and Secretaria Estadual da Saúde/PR for financial support and Dr. A. Leyva for his help in the translation and editing of the manuscript.

REFERENCES

American Public Association (2004) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. Edit. by CLESCERI, I.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Washington, D. C.

BRASIL. Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Dia Oficial da Rep Feder do Brasil**. Brasília. 25 mar. 2004. Seção I.

Beutin, L. (1991) The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med Microbial Immunol** 180, 167-182.

Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S. and Gleier, K. (2004) Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period. **J Clin Microbiol** 42:3. 1099–1108.

Blanch, A.R., Muñoz, L.B.L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J. and Jofre, J. (2006) Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking†. **Appl Environ Microbiol** 72:9, 5915-5926.

Boyer H.W. and Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J Mol Biol** 14, 459-472.

Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P. (2003) Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2*-EDL933 and/or *stx2*vhb subtypes. **J Clin Microbiol** 41:6, 2716–2722.

Chalmers, L.S., Aird, H. and Bolton, F.J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. **Symp Ser Soc Appl Microbiol** 124S-132S.

Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr microbial** 3, 95-99.

Friederich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. and Karch, H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **J Infect Dis** 185, 74–84.

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. and Blanch, A.R. (2005) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **Fems Microbiol Lett** 246, 55-65.

Gioppo, N.M.R.; Elias, W.P.; Vidotto, M.C; Linhares, R.E.; Saridakis, H.O.; Gomes, T.A.T.; Trabulsi, L.R.; Pelayo, J.S. (2000) Prevalence of HEp-2 cell-adherence *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolate from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, 147: 293-98.

Jackson, M.P., Newland, J.W., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. (1987a) Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. **Microb Pathog** 2, 147-153.

Jackson, M.P., Neill, A.D., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. and Newland, J.W. (1987b) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett** 44, 109-114.

Jerse, A.E., Martin, W.C., Galen, J.E. and Kaper, J.B. (1990) Oligonucleotide Probe for Detection of the Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor of Localized Adherent EPEC . **J Clin Microbiol** 28:12, 2842–2844.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infec Immun** 18, 775-779.

Louie, M., De Azavedo, J.C.S., Handelsman, M.Y.C., Clark, C.G., Ally, B., Dytoc, H., Sherman, M.P. and Bunton, J. (1993) Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype 10157:H7. **Infect Immun** 61, 4085–4092.

Lu Y, Iyoda S, Satou H, Satou H, Itoh K, Saitoh T and Watanabe H. (2006) A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect Immun** 10, 5747-55.

Maldonado, Y., Fiser, J.C., Nakatsu, C.H. and Bhunia, A.K. (2005) Cytotoxicity potential and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from environmental and food sources. **Appl Environ Microbiol** 71:4, 1890-1898.

Nataro, J., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M.M. and Morris Jr., G. (1995) Identification and Cloning of a Novel Plasmid Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. **Infect Immun** 63, 4721-4728.

Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** 11,142–201.

Paton, A.W. and Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **J Clin Microbiol** 36:1, 598- 602.

Paton, A. W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A. and Paton, J.C. (1999) Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **J Clin Microbiol** 37, 3357–3361.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C. and Paton, J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect Immun** 69, 6999-7009.

Paton, A.W. and Paton, J.C. (2002) Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **J Clin Microbiol** 40, 271–274.

Pisciotta, J.M., Rath, D.F., Stanek, P.A., Flanery, D.M. and Harwood, V.J. (2002) Marine bacteria cause false-positive results in the Colilert-18 rapid identification test for *Escherichia coli* in Florida waters. **Appl Environ Microbiol** 68, 539–544.

Robert, P.H., Davis, K.C., Garstka, W.R. and Bhunia, A.K. (2001) Lactate dehydrogenase release assay from Vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non verotoxin producing strains. **J Microbiol Meth** 43, 171-181.

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

Siegler, RL (2003) Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. **JAMA** 10, 1379-81.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano-desaminase. **Rev Microbiol** 13, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. **Rev Microbiol** 13, 230-235.

Vaz, T.M.I., Irino, K., Nishimura, L.S., Cergole-Novella, M.C. and Guth, B.E.C. (2006) Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol** 44, 798-804.

Yu, J.; Kaper, J.B. (1992) Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol Microbiol** 6, 411-417.

Caracterização Genotípica de Fatores de Virulência de *Escherichia coli* Diarreiogênicas Isoladas de Água para Consumo Humano

K. M. E. S. Lascowski¹ and J. S. Pelayo¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Correspondência: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Cx. P. 6001, 86051-970, Fax: +55 43 3371-4788, Londrina, PR, Brasil (e-mail: jspelayo@sercomtel.com.br).

RESUMO

O objetivo desse estudo foi detectar a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) em 300 cepas de *E. coli* isoladas de 209 amostras de água para consumo humano. Nenhuma cepa foi classificada como EPEC. Doze cepas de diferentes amostras de água foram classificadas como STEC e apresentaram os genes *stx1e/ou stx2*, *saa* e *hlyA*. Nenhuma cepa apresentou o gene *eae*. Das cepas pesquisadas, 77 pertencem ao patótipo ETEC, sendo que dessas, duas possuem os genes que expressam a Toxina Termolábil (LT II) e Toxina Termoestável (STa), 22 possuem apenas STa e 51 apenas LT II. Também verificou-se a presença do gene que expressa a toxina EAST1 em 8 cepas. Futuramente será realizada a sorotipagem e classificação das variáveis de *stx2*. Assim, podemos concluir que a presença dessas bactérias na água para consumo humano pode causar sérios problemas para a saúde da população, tendo em vista as implicações que a presença de *E. coli* diarreio gênicas pode trazer à saúde do homem. Um melhor controle da água fornecida à população, através da Rede pública, deve ser priorizado.

Palavras-chave: Sistema de distribuição de água. *Escherichia coli*. Diarréia. Genotipagem. Fatores de virulência.

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios estudos microbiológicos, a detecção de bactérias de origem fecal é utilizada para o controle da qualidade da água destinada ao consumo humano (Ashbolt 2004) e um monitoramento das fontes de água é essencial para manter a qualidade do serviço de abastecimento (Lisle et al. 1999).

Escherichia coli, que geralmente faz parte da microbiota gastrointestinal dos mamíferos, entretanto pode adquirir fatores de virulência característicos que permitem danos à saúde de indivíduos saudáveis, resultando em síndromes que podem incluir gastroenterites, infecções no trato urinário, sepse e meningites (Chen and Frankel 2005). Gastroenterites causadas por *E. coli* podem ser originadas por seis patótipos distintos de *E. coli* classificadas em: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina Shiga (STEC) onde de insere EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), enteroinvasiva (EIEC), aderência difusa (DAEC) e enteroagregativa (EAEC). Estes patótipos de *E. coli* diarreioagênica possuem diferentes perfis clínicos, epidemiológicos e patogênicos. Cepas pertencentes a cada patótipo são caracterizadas pela presença de fatores de virulência que podem ou não serem compartilhados, e podem ser distinguidas através da tipagem antigênica do lipopolissacarídeo (O) e flagelar (H) (Kaper et al. 2004).

Nesse estudo, foram pesquisados alguns fatores de virulência relacionados a EPEC típica e atípica, STEC, EHEC, ETEC e EAEC em 300 cepas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano na região Norte do Paraná – Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de água

Foram analisadas, 300 cepas de *E. coli* isoladas de fevereiro de 2005 a janeiro de 2006, de 196 amostras de água *in natura* e 13 tratadas, originadas de 27 municípios do norte do Paraná. A detecção de coliformes totais e *E. coli* foi realizada usando o método Colilert (Quanti-Tray/2002TM - IDEXX , representado pela SOVEREIGN - BR), seguindo as especificações do fabricante, aprovado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association, 2004) e pela Portaria do Ministério da Saúde nº. 518 (BRASIL, 2004).

Isolamento e identificação das cepas bacterianas

Para a recuperação das cepas de *E. coli*, as cartelas que apresentavam poços amarelos e fluorescentes (ONPG-positivo, MUG-positivo) foram selecionadas e alíquotas coletadas de 3 a 4 poços usando seringas estéreis para perfurar os poços da cartela, após desinfecção da superfície com álcool 70% foram semeadas em agar MacConkey (MC) (Biobrás, MG-BR) (Pisciotta et al. 2002). De cada placa de MC foram escolhidas aleatoriamente de 2 a 4 colônias fermentadoras de lactose e uma não fermentadora, e então, identificadas bioquimicamente através dos meios EPM (Toledo et al.1982_a), MILi (Toledo et al. 1982_b) e Citrato de Simmons (Biobrás, MG- BR). As cepas foram estocadas em caldo infuso de coração e cérebro (BHI) (Difco, Detroit, MC) com 20% de glicerina a -70°C até sua utilização.

Os principais genes pesquisados nesse trabalho associados aos diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênica através da PCR estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais genes pesquisados nos diferentes patótipos de *E. coli* diarreio gênica estudados nesse trabalho

Patótipo	Características - Genes Pesquisados
EPEC	<i>eae</i> e <i>bfp</i>
STEC	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>saa</i> , <i>hlyA</i> e <i>lpf</i>
ETEC	STa e LT II
EAEC	EAST1

Cepas bacterianas utilizadas nesse estudo como controles positivos estão descritas na Tabela 2. A cepa HB101 (*E. coli* K-12) (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969) foi usada como controle negativo em todos os testes.

Tabela 2 – Cepas Bacterianas usadas como controle positivo neste estudo

Cepa	Descrição	Referência
EDL933	EHEC	Yu & Kaper (1992)
98NK2	STEC	Paton <i>et al.</i> (2001)
E2348/69	EPEC	Jerse <i>et al.</i> (1990)
H10407	ETEC	Evans <i>et al.</i> (1975)
O42	EAEC	Nataro <i>et al.</i> (1995)

Deteção de genes através da PCR

Todas 300 cepas de *E. coli* isoladas foram testadas para presença das seqüências gênicas de *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *eae*, *saa*, *lpfA*, *bfp*, EAST-1, LT-II e ST-a. A Tabela 3 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados e as referências de todas seqüências estudadas. As reações de amplificação foram realizadas da seguinte maneira: culturas em ágar Luria-Bertani (LB) (Albright *et al.* 1989) foram suspensas em 300 µL de água Milli-Q (Millipore) e fervidas por 10 minutos para liberação e desnaturação do DNA bacteriano. A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em volumes de 25 µL, contendo 10 µL do lisado bacteriano, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador e 1.5 U *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL). Depois de amplificado, o produto de amplificação foi submetido à

eletroforese em gel de agarose 2% (Difco, Detroit, MC), corado com brometo de etídio (Gibco-BRL) e visualizado usando luz UV.

Tabela 3 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados e referências usadas neste estudo.

Gene Alvo	Sequência oligonucleotídeo iniciador (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>stx1</i>	F*: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R**: AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Jackson <i>et al.</i> 1987 _a
<i>stx2</i>	F: GGCCTGTCTGAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	Jackson <i>et al.</i> 1987 _b
<i>eae</i>	F: TCGTCACAGTTGCAGGCCTGGT R: CCGAAGTCTTATCAGCCGTAAAGT	800	Louie <i>et al.</i> 1993
<i>hlyA</i>	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Schmidt <i>et al.</i> 1995
<i>saa</i>	F: CGTGATGAACAGGCTATTGC R: ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	Paton <i>et al.</i> 2001
<i>bfp</i>	F: CAATGGTGCTTGCGCTTGCT R: GCCGCTTTATCCAACCTGGT	326	Gunzburg <i>et al.</i> 1995
<i>lpf</i>	F: ATGAAGCGTTAATTATATAG R: TTATTTCTTATATTCGAC	573	Doughty <i>et al.</i> 2002
<i>ast1</i>	F: CCATCAACACAGTATTCCGA R: GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	Yamamoto and Echeverria 1996
LT II	F: AGATATAATGATGGATATGTATC R: TAACCCTCGAAATAAATCTC	300	Schultsz <i>et al.</i> 1994
STa	F: TCCGTGAAACAACATGACGG R: ATAACATCCAGCACAGGCAG	244	So and McCarty 1980

*F: senso, **R: anti-senso.

RESULTADOS

Detecção dos fatores de virulência através da PCR

Das 300 cepas estudadas, 12 apresentaram o gene *stx* (sendo que 7 apresentaram *stx1* e 10 *stx2*), todas isoladas de amostras de água diferentes, pertencentes a 9 diferentes municípios. As 12 cepas positivas para *stx*, também foram positivas para *hlyA* e *saa*. Das outras 288 cepas estudadas, nenhuma foi positiva para *hlyA*, e apenas uma foi positiva para *saa*, sendo positiva também para *lpf*, outras 95 cepas também foram positivas para *lpf*, e dessas 9 foram positivas para *stx*. Quanto a presença da EAST1, 8 foram positivas. Cinquenta e três cepas apresentam LT II, 24 STa e dessas, duas apresentam ambas toxinas. Nenhuma das 300 cepas apresentaram *eae* e *bfp*. A Tabela 4 mostra o perfil genético das cepas estudadas.

Tabela 3 – Perfil genotípico das cepas estudadas

Nº de Cepas Encontradas	PCR									
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>lpf</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	EAST1	LT II	STa
2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
33	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
49	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
4	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
TOTAL	7	10	0	0	96	13	12	8	53	24

DISCUSSÃO

Fontes de água estão sendo consideradas reservatórios em potencial de *E. coli* (García – Aljaro et al. 2005). Nas duas últimas décadas, o consumo de água *in natura* vem diminuindo, contudo, os surtos de diarréias e doenças relacionadas ao consumo de água vêm crescendo (Beuchat et al. 1996).

A presença de *E. coli* no sistema de distribuição de água para consumo humano se constitui em um grande problema para a saúde da população (Blanch et al. 2006). Nesse trabalho, foram estudadas 300 cepas de *E. coli* isoladas de água, e 12 foram classificadas como STEC. Todas as 12 cepas apresentaram os genes *stx* (cinco possuem *stx1* e *stx2*, cinco somente *stx2* e duas *stx1*), *saa* e *hlyA*. Nenhuma das 300 cepas estudadas apresentou o gene *eae*. Siegler et al. (2003) quando inocularam Stx2 purificada em primatas, verificou que estes animais apresentaram Síndrome Uremica Hemolítica (SUH) o mesmo não ocorrendo com a Stx1. É importante salientar que das 12 cepas que possuem o gene *stx*, 10 apresentaram o gene *stx2*.

Das cepas pesquisadas, podemos verificar que 75 pertencem ao patótipo ETEC,

sendo que dessas, duas possuem LT II e STa, 22 possuem apenas STa e 51 apenas LTII. Não existem muitos estudos referentes à contaminação de água por ETEC, apesar desse patótipo ser um importante causador de diarreias em crianças, e, causar cerca de 700.000 mortes anualmente em alguns países em desenvolvimento (Menezes et al. 2003).

Quanto a presença do gene que possui a seqüência da EAST1, 8 cepas foram positivas. EAST1 é uma enterotoxina codificada por um plasmídio com grande homologia a STa de ETEC (Savarino et al. 1993; Harrington et al. 2006). Entretanto, EAST1 não está presente apenas em EAEC, estando distribuída entre *E. coli* patogênicas e não patogênicas (Savarino et al. 1995; Zhou et al. 2002).

Uma próxima etapa desse trabalho é classificar essas cepas de acordo com o sorotipo que pertencem e quais variáveis de *stx2* elas apresentam. Um outro dado importante é verificar se essas cepas apresentam a região LEE uma vez que o gene *saa* está somente presente em STEC LEE - negativa que também carregam o plasmídio portador de *hlyA*, insinuando que *saa* está situado neste grande plasmídio de virulência (Paton et al. 2001). Outro dado importante é verificar se as amostras que apresentaram os genes para as toxinas de ETEC (LT II e STa) estão sendo expressadas.

Assim podemos concluir que a presença dessas bactérias patogênicas em água para consumo humano pode causar riscos à saúde da população e demonstrando assim, falhas no sistema de tratamento e distribuição de água.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Secretaria Estadual da Saúde/PR pelo subsídio.

REFERÊNCIAS

Albright, L. M., Huala, E. and Ausubel, F.M. (1989) Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. **Annu Rev Genet** 23, 311–336.

American Public Health Association (2004) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. Edit. by CLESCERI, I.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Washington, D. C.

Ashbolt, N. J. (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicol** 98, 229–238.

BRASIL. Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Dia Oficial da Rep Feder do Brasil**. Brasília. 25 mar. 2004. Seção I.

Blanch, A.R., Muñoz, L.B.L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J. and Jofre, J. (2006) Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking†. **Appl Environ Microbiol** 72:9, 5915-5926.

Boyer H.W. and Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J Mol Biol** 14, 459-472.

Beuchat, L.R. (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J Food Prot** 59, 204–216.

Chen, H. D. and Frankel, G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiol Rev** 29, 83-98.

Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M., Hartland, E. L. (2002) Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun** 12, 6761-6769.

Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J., David, J.R., Chase, G. and Gorbach, S.L. (1975) Plasmid-Controlled Colonization Factor Associated with Virulence in *Escherichia coli* Enterotoxigenic for Humans. **Infect Immun** 12, 656-667.

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. And Blanch, A.R. (2005) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **Fems Microbiol Lett** 246, 55-65.

Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.J. and Riley L.W. (1995) Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. **J Clin Microbiol** 33, 1375–1377.

Harrington, S.M., Dudley, E.G. and Nataro, J.P. (2006) Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett** 254, 12–18.

Jackson, M.P., Newland, J.W., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. (1987a) Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. **Microb Pathog** 2, 147-153.

Jackson, M.P., Neill, A.D., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. and Newland, J.W. (1987b) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett** 44, 109-114.

Jerse, A.E., Martin, W.C., Galen, J.E. and Kaper, J.B. (1990) Oligonucleotide Probe for Detection of the Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor of Localized Adherent EPEC. . **J Clin Microbiol** 28:12, 2842–2844.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. **N Rev Microbiol** 2, 123-138.

Lisle, J. T., Phyle, B. H., McFeters, G. A. (1999) The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol** 29, 42–47.

Louie, M., De Azavedo, J.C.S., Handelsman, M.Y.C., Clark, C.G., Ally, B., Dytoc, H., Sherman, M.P. and Bunton, J. (1993) Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype 10157:H7. **Infect Immun** 61, 4085–4092.

Menezes, C. A., Gonçalves, D. S., Amianti, J., Fernandes, I., Taddei, C. R., Koga, P. C., Trabulsi, L. R., Martinez, M. B. Piazza, R. M. F. (2003) Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigênica *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz J Microbiol** 34, 11-13.

Nataro, J., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M.M. and Morris Jr., G. (1995) Identification and Cloning of a Novel Plasmid Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and Shigella Strains. *Infect Immun* 63, 4721-4728.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C. and Paton, J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect Immun** 69, 6999-7009.

Pisciotta, J.M., Rath, D.F., Stanek, P.A., Flanery, D.M. and Harwood, V.J. (2002) Marine bacteria cause false-positive results in the Colilert-18 rapid identification test for *Escherichia coli* in Florida waters. **Appl Environ Microbiol** 68, 539–544.

Savarino S.J., Fasano A. and Watson J. (1993) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci USA** 90, 3093–3097.

Savarino S.J., McVeigh A. and Watson J. (1995) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J Infect Dis** 173, 1019–1022.

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

Schultsz, C., Pool, G.J., van Ketel, R., Wever, P.S. and Dankert, J. (1994) Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Stool Samples by Using Nonradioactively Labeled Oligonucleotide DNA Probes and PCR. **J Clin Microbiol** 32, 2393-2397 .

Siegler, RL (2003) Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. **JAMA** 10, 1379-81.

So, M. and McCarthy, B.J. (1980) Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigênica *Escherichia coli* strains *Escherichia coli* heat-stable (ST) toxin/infantile and travelers' diarrhea. **Pro Nat Acad Sci** 77, 4011-4015.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano-desaminase. **Rev Microbiol** 13, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. **Rev Microbiol** 13, 230-235.

Yamamoto, T., Wakisaka, N., Nakae, T., Kamano, T., Serichantalergs, O. and Echeverria, P.(1996) Characterization of a Novel Hemagglutinin of Diarrhea-Associated *Escherichia coli* That Has Characteristics of Diffusely Adhering *E. coli* and Enteroaggregative *E. coli*. **Infect Immun** 64, 3694–3702 .

Yu, J. and Kaper, J.B. (1992) Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol Microbiol** 6,411-417.

Zhou Z., Ogasawara J. and Nishikawa Y. (2002) An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). **Epidemiol Infect** 128, 363–371.

4 CONCLUSÃO

Tendo em vista a importância da detecção e caracterização de agentes emergentes e reemergentes, avaliamos através de estudo epidemiológico, a presença de cepas de *E. coli* em amostras de água destinadas ao consumo humano, nos municípios pertencentes a 17ª e 18ª Regionais de Saúde no Estado do Paraná.

Isolamos 300 cepas de *E. coli*, e, através da detecção de genes através da PCR, concluímos que 12 cepas pertencem ao patótipo STEC, 75 cepas ao patótipo ETEC. Nenhuma cepa foi classificada como EPEC.

Quanto à expressão dos genes *stx1* e *stx2*, avaliada utilizando-se células Vero, concluímos que as 12 cepas estão expressando a toxina Shiga. O mesmo acontece com a expressão de *hlyA*, avaliada através da capacidade de hemólise em ágar sangue de carneiro a 5%.

Em relação ao padrão de adesão em células HEp-2, das 300 cepas estudadas, 134 não aderiram à célula, 151 cepas aderiram de forma AA, sendo que 4 dessas apresentaram cordões entre as células, 12 cepas aderiram da forma semilocalizada e 3 na forma difusa.

Uma próxima etapa desse trabalho é classificar essas cepas de acordo com o sorotipo que pertencem e quais variáveis de *stx2* elas apresentam.

Assim podemos concluir que a presença dessas bactérias patogênicas em água para consumo humano pode causar riscos à saúde da população e demonstrando assim, falhas no sistema de tratamento e distribuição de água.