



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE
Escherichia coli DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA
SUBTERRÂNEA NO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE
Escherichia coli DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA
SUBTERRÂNEA NO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Caroline Rodrigues da.

Caracterização molecular e fenotípica de Escherichia coli diarreio gênica isoladas de água subterrânea no norte do estado do Paraná / Caroline Rodrigues da Silva. - Londrina, 2018.

60 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Água para consumo - Tese. 2. Água subterrânea - Tese. 3. Escherichia coli - Tese. 4. DEC - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA NO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Ligia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora, Jacinta Pelayo, por ter aberto as portas de seu laboratório à cinco anos, pela orientação e pela dedicação na elaboração deste trabalho.

Agradeço a meus pais, Delmicio e Lucineia, pelo apoio em todos esses anos de graduação, mestrado e na vida.

Aos meus queridos irmãos Camila, Jennifer e Lucas, pelo companheirismo – são parte de mim. Ao meu sobrinho Nicolas, que à nove anos tornou minha vida mais alegre.

Agradeço ao meu namorado, Bruno, pelos anos de amor e por sempre torcer por mim nesses anos de estudo.

Ao meu cunhado Lucas Diniz, pelos ensinamentos e pelas conversas produtivas.

Agradeço a Rosangela, Aurélio, Luana, Cassia e Vitor por todo o apoio, vocês são a minha segunda família.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, Kawana, Matheus, Taynara, Angelica, Gustavo e Wellington por todos os momentos de descontrações e risadas, por toda ajuda nos experimentos e por todo o aprendizado.

Agradeço aos mestres Tatiane, Paulo e Nicole, por toda a ajuda no começo da minha jornada acadêmica e a todos os estagiários que me acompanharam e me ajudaram nesses cinco anos de laboratório de bacteriologia.

Agradeço a Claci pela cooperação técnica no decorrer deste trabalho e em todos os anos que estou no laboratório.

Aos professores Sérgio, Lúgia e Renata por aceitarem compor minha banca de defesa de plano e dissertação.

Agradeço ao laboratório de virologia, principalmente a Karoline e Daniele por toda a ajuda com a cultura de células.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente Kenya e Marco, pacientes em minhas ausências, e por dividirem comigo momentos felizes.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido e a UEL, a qual tive a honra de ter sido aluna.

Enfim, um muito obrigada a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram na elaboração deste trabalho.

“Construímos muros demais e pontes de menos.”
Isaac Newton
(1643-1727)

SILVA, Caroline Rodrigues da. **Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* diarreioagênica isoladas de água subterrânea no norte do estado do Paraná**. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

As doenças transmitidas pela água, como a diarreia causada pela *Escherichia coli* diarreioagênica (DEC), são um dos principais problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. Nesse contexto, este trabalho analisou a qualidade microbiológica de amostras de água utilizadas para consumo humano providas de minas e poços rasos do norte do Estado do Paraná, no Brasil, além de caracterizar genotípica e fenotipicamente as cepas de DEC isoladas. Das 210 amostras estudadas, 153 (72,9%) apresentaram coliformes totais e 96 (45,7%) *E. coli* e dessas, 27 (28,1%) apresentavam DEC, sendo 13 (48,1%) *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), oito (29,6%) *E. coli* enteroagregativa (EAEC), quatro (14,8%) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), uma (3,7%) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e uma (3,7%) *E. coli* enteroinvasora (EIEC). Foram encontrados 25 sorotipos diferentes e um isolado de EPEC atípica apresentou o sorotipo O44037:H7, pela primeira vez relatado no Brasil. Em relação ao filogruppo, 17 (63%) pertenciam ao B1, cinco (18,5%) ao C, três (11,1%) ao B2 e dois (7,4%) ao E. Em células HEp-2, 25 DEC (92,6%) foram aderentes e a adesão agregativa foi a mais prevalente, 20 (74%), e todas DEC formaram biofilme. As 13 cepas de STEC produziram efeito citotóxico em células Vero e quatro (14,8%) DEC foram resistentes a um dos antibióticos testados. Os resultados demonstram que a água é um importante reservatório de DEC, podendo atuar como fonte de infecção para humanos e animais, e que medidas de prevenção como a proteção de minas e poços rasos e o tratamento da água devem ser adotadas, evitando assim, contaminações.

Palavras-chave: Água para consumo. Água subterrânea. *Escherichia coli*. DEC.

SILVA, Caroline Rodrigues da. **Phenotypic and molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from groundwater source in the North of Parana State**. 2018. 60 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The water-transmitted diseases, as gastroenteritis caused by diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), are the most important public health concern in development countries. In the context, this study analyzed the microbiological quality of water samples used to human consumption from water mines and shallow wells in the North of Parana State, Brazil, besides characterizing genotype and phenotypically the isolated DEC strains. Among 210 analyzed samples, 153 (72.9%) were contaminated by total coliforms and 96 (45.7%) by *E. coli*, being that 27 (28.1%) presented DEC features: the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) gene was identified in 13 (48.1%), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) gene in eight (29.6%), EPEC Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) gene in four (14,8%), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in one (3.7%) and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) gene in one (3.7%). It was found 25 different serotypes and one isolate of atypical EPEC presented serotype O44037: H7, for the first time reported in Brazil. In relation to phylogroup, 17 (63%) belonged to B1, 5 (18.5%) to C, 3 (11.1%) to B2 e 2 (7.4%) to E. In HEp-2 cells, 25 DEC (92.6%) were adherent and aggregative adhesion was the most prevalent, 20 (74%), and all DEC formed biofilm. The thirteen STEC strains produced cytotoxic effect in Vero cells and 4 (14.8%) of isolated DEC samples were resistant to one tested antibiotic. The results showed that the water is an important recharge of DEC, and may act as infection source to humans and animals. Prevent tools as mines and shallow wells protection and water treatment should be adopted to avoid contamination.

Keywords: Water to consumption. Groundwater. *Escherichia coli*. DEC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Água e saúde.....	9
2.2	<i>Escherichia coli</i>	11
2.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	12
2.4	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	16
2.5	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC) e <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	19
2.6	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	22
2.7	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	24
2.8	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa (DAEC)	26
3	REFERÊNCIAS	28
4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivos Gerais	37
4.2	Objetivos Específicos.....	37
5	TRABALHO CIENTÍFICO	38
6	CONCLUSÃO	60

1 INTRODUÇÃO

A contaminação fecal da água potável é um significativo problema de saúde, responsável por inúmeros casos de diarreia – principalmente em crianças e viajantes a países em desenvolvimento. Estima-se que a água contaminada tenha causado mais de 20 milhões de óbitos no mundo, dos quais, mais de 80% foram em crianças menores de cinco anos. Nessas regiões, a falta de acesso a água potável, saneamento e higiene adequada introduzem fatores de risco à mortalidade e morbidade, relacionadas principalmente à diarreia infantil.

O consumo de água subterrânea é uma prática muito utilizada em todo o mundo. No Brasil, 40% da população utilizam tal fonte para consumo. A captação de água subterrânea, sem condições adequadas, aumenta a vulnerabilidade à contaminação relacionada a atividades antropogênicas ou naturais, podendo se tornar um veículo de transmissão de doenças.

Escherichia coli diarreio gênica (DEC) são classificadas em oito patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC), e, ainda, a subcategoria de STEC, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). As DEC são um dos principais patógenos envolvidos com doenças transmitidas por água e alimentos, sendo um dos principais agentes etiológicos de infecções intestinais.

Dessa forma, os objetivos desse estudo foram: (i) avaliar a qualidade microbiológica da água para consumo *in natura*, proveniente de minas e poços rasos, no norte do Paraná; (ii) determinar a presença de genes de virulência de DEC entre os isolados de *E. coli*; (iii) determinar os grupos filogenéticos e sorotipos mais prevalentes; (iv) caracterizar as DEC fenotipicamente em relação ao tipo de adesão, formação de biofilme, citotoxicidade e suscetibilidade aos antimicrobianos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água e saúde

Água potável, saneamento básico e higiene adequada são fundamentais para saúde, sobrevivência, crescimento e desenvolvimento da sociedade. A falta de recursos hídricos em algumas regiões, associada ao saneamento inadequado e a contaminação bacteriana e química das águas, faz dela um veículo de doenças, agravantes que se intensifica em pessoas mais suscetíveis, como em crianças, idosos e pessoas debilitadas, principalmente quando vivem em condições insalubres (WHO, 2011).

Embora as doenças relacionadas com a água tenham sido amplamente eliminadas em países mais desenvolvidos, elas continuam a ser uma grande preocupação nos países em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2000, existiam quatro bilhões de casos de diarreia a cada ano, além de milhões de outros casos de doenças associadas à falta de acesso a água potável. No entanto, muitas doenças não são diagnosticadas e relatadas, fazendo com que os dados sejam considerados subestimados (WHO, 2000).

Em 2015, em termos globais, 96% da população urbana utilizavam fontes de água potável, em comparação com 84% da população rural. Contudo, a porcentagem de pessoas sem acesso à água potável representa um total de 663 milhões de pessoas, e, dentre elas, oito em cada dez, vivem em áreas rurais (WHO/UNICEF, 2015).

O abastecimento de água potável provém de águas superficiais e subterrâneas. Dentre as subterrâneas, as formas de captação incluem: construções de captações em fontes (minas ou nascentes), poços rasos, poços tubulares e drenos horizontais. As alternativas de extração de águas subterrâneas mais rasas, isto é, em torno de 20 metros, em função da sua pouca profundidade, estão mais suscetíveis à contaminação por esgotos sanitários, resíduos de agrotóxicos e à destinação inadequada do lixo – e, na maioria das vezes, são empregadas para abastecimentos individuais na zona rural, sendo um risco à saúde dessa população (HELLER; PADUA, 2010).

A busca por fontes hídricas alternativas que envolvem a captação de água subterrânea para complementar o consumo humano é uma prática muito utilizada, mesmo em território brasileiro rico em recursos hídricos superficiais. Em 2005, existiam cerca de 416 mil poços cadastrados no País, com um aumento de 10.800 ao ano, fornecendo água para 30 a 40% da população. A água de poços e fontes vem sendo utilizada para diversos fins, tais como o abastecimento humano, irrigação, indústria e lazer. No Brasil, 15,6% dos domicílios utilizam exclusivamente água subterrânea (ANA, 2005).

No Brasil, as águas subterrâneas podem ser a única fonte disponível para as populações mais pobres, apesar de sua qualidade duvidosa. Isso também ocorre nas pequenas urbanizações, populações rurais e aldeias agrícolas, bem como em instalações longe do sistema público de abastecimento de água, como aeroportos, estações de serviço e hotéis do País (HIRATA; CONICELLI, 2012).

As doenças transmitidas pela água são um dos principais problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. Estima-se que a água contaminada tenha causado mais de 20 milhões de óbitos, dos quais mais de 80% foram em crianças menores de cinco anos. Uma parte importante das doenças em todo o mundo – cerca de 10% – poderia ser prevenida por melhorias relacionadas à água potável, saneamento, higiene e gestão de recursos hídricos (PRÜSS-ÜSTÜN *et al.* 2008).

Entre os vários poluentes da água potável, a microbiana foi considerada uma das ameaças mais sérias para saúde pública. A maioria dos agentes infecciosos pode ser adquirida através de transmissão fecal-oral, resultante da contaminação de água e alimentos por dejetos, direta ou indiretamente. Assim, em 1986, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) recomendou o uso de *Escherichia coli* como organismo indicador de contaminação fecal para a água doce e membros do gênero *Enterococcus* para água doce e salgada. A presença de *E. coli* em água indica contaminação por material fecal de seres humanos ou de outros animais endotérmicos, além de um alto potencial de presença de organismos patogênicos (USEPA, 2000).

No Brasil, os padrões de potabilidade da água são estabelecidos pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, que além de apresentar os valores máximos permissíveis para os parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e

vigilância da qualidade da água. Quanto ao padrão microbiológico, a água para consumo humano não deve apresentar coliformes totais e *E. coli* em 100 mL de amostra (BRASIL, 2011).

2.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence à família Enterobacteriaceae, que constitui um dos principais agentes de infecções intestinais. As bactérias da espécie *E. coli* são bastonetes gram negativos e representam o principal anaeróbico facultativo que coloniza o sistema gastrointestinal de seres humanos e outros animais endotérmicos, proporcionando benefícios ao hospedeiro. Entretanto, existem algumas cepas que podem causar doenças em indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos, devido à presença de um ou mais genes de virulência encontrados em elementos genéticos, como, material genético fágico, plasmídios, ilhas de patogenicidade e transposons (KAPER *et al.*, 2004).

Infecções por *E. coli* patogênica podem ser limitadas às superfícies da mucosa ou podem disseminar por todo o corpo. Cepas patogênicas de *E. coli*, além de causar infecções intestinais (*E. coli* diarréiogênica – DEC), também são capazes de causar infecções extraintestinais (ExPEC) em seres humanos, como infecções do trato urinário, causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC) e sepsis/meningite por *E. coli* associada à Meningite Neonatal (NMEC) (CLEMENTS *et al.*, 2012).

As doenças gastrointestinais são um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade na infância. Saneamento básico e melhoria na renda familiar estão associados a taxas reduzidas dessa enfermidade (ANDRADE *et al.* 2009).

Considerando os seus mecanismos de virulência específicos as DEC estão agrupadas em oito categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC). Há, ainda, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que é uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004, CLEMENTS *et al.*, 2012).

Os patótipos de *E. coli* são caracterizados sorologicamente com base nos antígenos de superfície: os antígenos somáticos (O), que são relacionados a polissacarídeos de membrana externa (lipopolissacarídeo – LPS); nos flagelares (H), relacionados a proteínas dos flagelos; e nos capsulares (K), relacionados a polissacarídeos capsulares. Os patótipos são passíveis de classificação em sorogrupos (apenas antígeno O) ou sorotipos (antígenos O e H) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A identificação e combinações de alguns genes podem ser usadas para caracterizar amostras de *E. coli* em grupos filogenéticos. Desde a sua introdução, em 2000, em que era possível a identificação de quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D), a tipagem filogenética usando a Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) se tornou amplamente utilizada devido à simplicidade e à rapidez (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Em 2013, Clermont *et al.*, por meio de uma PCR quadruplex, melhoraram o método, tornando possível a identificação de sete filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F), tendo correspondência de 80 a 95% com a análise de MLST (*Multi-locus sequence typing*), indicando que o teste pode ser utilizado para estudar a diversidade filogenética de amostras de *E. coli* (GORDON *et al.*, 2008; CLERMONT *et al.*, 2013).

A sorotipagem tem sido amplamente utilizada para caracterizar a *E. coli*, mas apenas a sorologia não é adequada para caracterizá-las como patogênicas, de maneira que as pesquisas de fatores de virulência estão mais diretamente associadas com a patogenicidade do que os antígenos O e H (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002). A identificação das cepas patogênicas de *E. coli* baseia-se, sobretudo, na presença de genes de virulência associados a cada categoria do enteropatógeno e utiliza, principalmente, métodos moleculares (NATARO; KAPER, 1998, KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo de *E. coli* reconhecido por causar diarreia, tendo surgido na década de 40 e 50 como uma das principais causas de diarreia epidêmica em creches, assim como uma das principais causas de diarreia infantil esporádica na comunidade, com até 50% de mortalidade (LEVINE; EDELMAN, 1984).

O termo “*Escherichia coli* enteropatogênica” foi cunhado por Neter *et al.* (1955) para designar cepas de *E. coli* epidemiologicamente associada à diarreia infantil, no entanto, seu potencial patogênico só foi aceito em 1978, quando Levine *et al.* fizeram testes com voluntários, os quais desenvolveram diarreia após ingerir o microrganismo.

Com base em métodos moleculares (identificação do gene *eae*), a EPEC é responsável, em média, por 5 a 10% dos episódios de diarreia pediátrica nos países em desenvolvimento (OCHOA *et al.* 2008); estudos epidemiológicos demonstram que EPEC são um dos maiores responsáveis em casos de diarreia em crianças no Brasil (GOMES *et al.* 1991; ARAUJO *et al.* 2007; DIAS *et al.* 2016). As infecções em adultos são mais raras, porém, há registros de EPEC responsáveis por surtos de diarreia em adultos, provavelmente devido a uma alta ingestão de inóculo (NATARO; KAPER, 1998).

É necessária uma dose de 10^8 e 10^{10} de bactérias para causar doença em experiências com voluntários adultos. A dose para lactentes não é conhecida, mas acredita-se que seja muito maior (DONNENBERG *et al.*, 1993). Em relação ao tropismo celular, EPEC coloniza o intestino delgado, especificamente o duodeno, o íleo terminal e as placas de Peyer (LAW *et al.*, 2013).

Originalmente as EPEC eram classificadas a partir dos principais sorogrupos que causavam diarreia em crianças, e assim permaneceu até a década de 70; posteriormente eram definidas pelo padrão de adesão que apresentavam em ensaios de adesão em cultura de células e teste de FAS (*fluorescent actin-staining* – coloração fluorescente à actina) e, depois, passaram a ser identificadas principalmente pela presença de genes de virulência específicos (CHEN; FRANKEL, 2005).

Todas as cepas de EPEC possuem, no cromossomo, uma ilha de patogenicidade (PAI) de 35 kb denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), enquanto outras apresentam, além da região LEE, um plasmídeo de 60 MDa denominado EAF (*EPEC adherence factor*) (McDANIEL *et al.*, 1995). Devido a essas características genotípicas, a EPEC foi classificada em 1995, no Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, em EPEC típica (EPECt) (cepas que contém o plasmídeo EAF) e EPEC atípica (EPECa) (cepas que não contém o plasmídeo EAF) (KAPER, 1996).

Em 1987, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu que os seguintes sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O128, O142, e O158, seriam considerados "sorogrupos de EPEC". Os sorotipos de EPEC mais frequentemente encontrados são: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34 para EPECt e O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 para EPECa (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As cepas EPECt e EPECa também possuem diferentes padrões de adesão. Enquanto as cepas EPECt exibem o padrão de aderência localizado (AL), as cepas atípicas podem produzir aderência localizada, aderência difusa (AD) ou padrão de aderência agregativa (AA) (HU; TORRES, 2015).

As EPECa já foram isoladas de diversos animais como gatos, cachorros, veados, vacas, cavalos, patos e gansos; (ISHII; MEYER; SADOWSKY, 2007), cervo, javali selvagem, coruja (ALONSO *et al.*, 2017), ovinos (MARTINS *et al.* 2016), pássaros selvagens e pombos urbanos (SANCHES *et al.*, 2017, BORGES *et al.*, 2017), queijo feito a partir de leite não pasteurizado (de CAMPOS *et al.*, 2017), água para consumo (PARK *et al.* 2018), enquanto que as EPECt são identificadas geralmente em seres humanos e em raras ocorrências entre animais silvestres (macaco de cativo e coio) e, no ambiente aquático natural, como rios e lagoas (MOURA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.* 2016).

A patogênese de EPEC reside na capacidade de colonizar a mucosa intestinal de hospedeiros humanos e de outros animais por meio da lesão chamada *attaching and effacing* (A/E), caracterizada pela ligação íntima da bactéria a células epiteliais intestinais causando mudanças no citoesqueleto. Essas mudanças causam desestruturação das microvilosidades intestinais, acumulação e polimerização de actina F diretamente abaixo das bactérias aderentes, formando estruturas celulares semelhantes a pedestais (MOON *et al.*, 1983).

A capacidade de induzir lesões A/E requer a ilha de patogenicidade cromossômica LEE (*Locus of enterocyte effacement*) (McDANIEL; KAPER, 1997), que codifica: genes reguladores, adesina intimina codificada pelo gene *eae*, chaperonas, Sistema de Secreção do Tipo 3 (T3SS) codificado pelos genes *esc*, proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e seis efetores (Tir, EspF, Map, EspG, EspH e EspZ), sendo o Tir (*translocated intimin receptor*) um receptor de

intimina bem caracterizado, que é translocado e inserido na membrana da célula do hospedeiro (GAYTÁN *et al.*, 2016).

Além das proteínas codificadas por LEE, outros fatores complementares são codificados pelo plasmídeo EAF, nesse plasmídeo encontra-se: o operon *bfp*, o qual contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP) – uma fimbria do tipo IV organizada em forma de feixes; o operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica genes reguladores de fatores de virulência codificados por gene presentes em LEE e EAF; além da sequência críptica referente ao fragmento sonda EAF, já utilizada como marcador molecular de EPEC (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991, HAZEN *et al.* 2015).

Todo o processo que leva a lesão A/E pode ser dividido em quatro fases. Primeiramente ocorre a ligação inicial à célula epitelial com filamentos associados à superfície (filamentos EspA), adesina fimbrial (BFP) e flagelo. Numa etapa seguinte, as bactérias utilizam o T3SS para ativar várias proteínas efetoras, incluindo o receptor de intimina translocado (*tir*) para a célula hospedeira, levando à desestruturação das microvilosidades. Na terceira fase, ocorre uma ligação íntima da bactéria ao enterócito, mediada pela ligação intimina-Tir, resultando em acúmulo de actina polimerizada e outros componentes do citoesqueleto nessa região. Os rearranjos de actina resultam na formação de estruturas semelhantes a pedestais no qual a EPEC permanece aderida. Essas alterações na mucosa intestinal levam ao desequilíbrio eletrolítico que culmina na diarreia (DONNENBERG; KAPER; FINLAY; 1997, PEARSON *et al.*, 2016).

Os casos diarreicos causados por EPEC variam de infecções subclínicas a infecções fatais. As cepas de EPECt podem causar diarreia secretória abundante com muco e perdas significativas de água e eletrólito nas fezes. Além disso, pode levar a uma má absorção de nutrientes, o que evolui para o agravamento nutricional e diarreia persistentes. No entanto, também há muitos relatos que mostram que a EPECa causa surtos relacionados à diarreia (HU; TORRES, 2015).

Há uma diferença epidemiológica notável entre sorotipos de EPECt e EPECa de acordo com a região geográfica. Além disso, nos países desenvolvidos EPECa tornou-se uma causa mais frequente de diarreia do que EPECt. A partir da década de 90, estudos mostram que essa mudança também está ocorrendo em alguns países em desenvolvimento (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002,

FRANZOLIN *et al.*, 2005). No Brasil, por exemplo, 92% dos isolados de EPEC de crianças com diarreia entre 2001 e 2002 foram atípicos, em comparação com 38% em um estudo de 1998-1999. No entanto, outros estudos ainda relatam que EPECt é mais prevalente do que EPECa como causa de diarreia em outros países em desenvolvimento, como na África e na Ásia (GOMES *et al.*, 2016).

2.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC foi descrita pela primeira vez em 1987 por Nataro, em um estudo que examinava diferentes padrões de adesão em cepas de *E. coli* em culturas de células HEp-2. Essas cepas foram isoladas de crianças com e sem diarreia em Santiago no Chile. Foi observado cepas com aderência AA, em um arranjo semelhante a “tijolos empilhados”, distinguido pela autoaglutinação proeminente das células bacterianas umas às outras na superfície das células, bem como na lamínula de vidro livre de células (NATARO *et al.*, 1987).

Desde a sua descoberta, um número crescente de estudos associam a EAEC com casos de diarreia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; GOMES *et al.*, 2016). Com base em uma meta-análise descrita por Huang *et al.* (2006), foi demonstrado que EAEC é significativamente associada à doença diarreica aguda em crianças que vivem em regiões em desenvolvimento e industrializadas; adultos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) residentes em regiões em desenvolvimento; viajantes para regiões em desenvolvimento e adultos de regiões em desenvolvimento, mostrando que as cepas de EAEC são relativamente heterogêneas.

Em 1992, um estudo realizado no Brasil, mostrou que a diarreia persistente causada por EAEC estava ligada a insuficiências de crescimento, diminuição do desenvolvimento intelectual e morte em crianças brasileiras com poder aquisitivo baixo (LIMA *et al.* 1992). Ainda no Brasil, Havt *et al.* (2017) observaram uma alta prevalência de EAEC (39,94%) em crianças nutridas e desnutridas, independentemente de diarreia, e as amostras que apresentaram os genes *aaIC* e *aatA* foram as mais prevalentes (56,1%, 37/66) e associadas com a desnutrição.

Vários estudos sugerem que a EAEC é um importante agente emergente de diarreia infantil em países desenvolvidos e em desenvolvimento (KNUTTON *et al.*

2001; CANATA *et al.* 2016), tendo sido associada a surtos de diarreia transmitidos pelos alimentos (HEDBERG *et al.* 1997, KOO *et al.* 2008), como no caso em que 2.697 (40,6%) crianças japonesas desenvolveram diarreia grave ao consumirem lanche escolar em que a EAEC foi encontrada em 10% dos casos (ITOH, *et al.* 1997).

Uma cepa de EAEC produtora de toxina Shiga (STEAEC) foi detectada como causa do maior surto conhecido de Síndrome Hemolítico Urêmica (SHU) (852 casos), ocorrido no norte da Alemanha em 2011. A ameaça à saúde pública devido à EAEC torna importante identificar os reservatórios a partir dos quais podem surgir epidemias ou surtos em seres humanos (BIELASZEWSKA *et al.* 2011; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Com base em um estudo feito por Orden *et al.* (2017), os ruminantes, como as cabras, gados e ovelhas, foram constatados ser improváveis reservatórios significativos de EAEC. Contudo, a EAEC já foi detectada em cavalos doentes (LIBERATORE *et al.* 2007), pomba de solo: *Columbina talpacoti* (BEZERRA *et al.* 2017), águas residuais tratadas (ADEFISOYE; OKOH, 2016), água subterrânea (LÖSCH *et al.* 2015), águas portuárias (COSTA *et al.* 2014) e também foi relatada sobreviver em águas minerais e nascentes durante 60 dias (VASUDEVAN *et al.* 2003).

Em âmbito molecular, os genes que codificam para o fenótipo agregativo estão contidos em um grande plasmídeo (pAA) de 60 MDa, que codifica fimbrias chamadas de fimbrias de aderência agregativa (AAFs), que exibem estrutura de feixes semiflexíveis (NATARO, *et al.* 1992). Cinco variantes da subunidade estrutural principal de AAF foram descritas até agora: AggA (AAF/I), AafA (AAF/II), Agg3A (AAF/III), Agg4A (AAF/IV) e Agg5DCBA (AAF/V), todas reguladas pelo ativador transcricional AggR, situado no plasmídeo de virulência pAA (JØNSSON *et al.* 2015).

O regulador AggR presente no pAA controla, pelo menos, 44 genes contidos no cromossomo e plasmídios, incluindo múltiplos fatores de virulência de EAEC, emergindo como o regulador central da virulência (MORIN *et al.* 2013). Devido a isso, o termo "EAEC típica" começou a ser usado para se referir a cepas que apresentam o regulador AggR, e "EAEC atípica" para cepas que não apresentam o AggR (Nataro *et al.* 2003).

Estudos epidemiológicos e de patogênese de EAEC são focados no regulador transcricional AggR e em vários genes associados a fatores de virulência

presentes em plasmídios e cromossomo. Estes incluem genes que codificam uma diversidade de adesinas, toxinas e proteínas envolvidas na patogênese de EAEC, como a dispersina ou Aap (*anti aggregation protein*) codificada pelo gene *aap* (*anti-aggregation protein dispersin*), responsável por mediar a dispersão na mucosa intestinal; *aatA*, que codifica um sistema de transporte relacionado ao TolC para a dispersão; *shf* (*Shigella flexneri* homologue), que codifica uma proteína relacionada com a formação de biofilme; EAST-1 (*enteroaggregative heat-stable toxin 1*), uma enterotoxina termo-estável codificada pelo gene *astA*, e as proteínas autotransportadoras Pet (*plasmid- encoded toxin*) e Pic (*protein involved in colonization*) (SUSAN *et al.* 2006; CROXEN; FINLAY, 2010).

Apesar do padrão AA à células HEp-2 ser a principal característica que define a EAEC, infelizmente, este método tem várias limitações para a sua utilização em grandes estudos epidemiológicos, porque requer pessoal bem treinado, é caro e limitado a laboratórios com instalações de cultura celular (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

Numerosos estudos epidemiológicos sobre EAEC utilizaram os genes *aatA* (correspondente ao fragmento sonda CVD432) e *aggR* como as principais ferramentas para investigar a incidência da EAEC (WILSON *et al.* 2001, KAHALI *et al.* 2004, COHEN *et al.* 2005, NAKO *et al.* 2016). Contudo, nesses estudos não incluem EAECa por não apresentarem o plasmídeo pAA. Dos genes codificados cromossomicamente, os genes do operon *aai* (*aggR- activated island*) seriam os genes alvos mais adequados para identificar EAECa. Desse modo, estudos epidemiológicos estão incluindo tais genes (CARBONARI *et al.* 2014, VIJAY *et al.* 2015, HAVT *et al.* 2017).

O operon *aai* é composto por 25 genes (de *aaiA* a *aaiY*) que codifica um sistema de secreção do tipo VI e está presente em uma ilha de patogenicidade (PAI) inserida no *locus* do tRNA *pheU* no cromossomo da amostra EAEC 042 (DUDLE *et al.* 2006).

Jenkins *et al.* (2006) demonstraram que os genes *aatA* e *aaiA* podem ser bons marcadores no diagnóstico de EAECt e EAECa. Andrade, Gomes e Elias (2014) desenvolveram uma multiplex PCR para identificação de EAECt e EAECa, utilizando como genes de diagnóstico o *aaiA*, *aaiG*, *aggR* e *aatA*. Como resultado, o método de diagnóstico molecular apresentou-se com 94,8% de sensibilidade e

94,3% de especificidade, sendo capaz de detectar os dois grupos de EAEC nas amostras pesquisadas.

Lima *et al.* (2013), por sua vez, pesquisaram a prevalência de EAEC em um estudo de caso-controle em 166 crianças da região Nordeste do Brasil. Para diagnosticar cepas EAEC, foram utilizados os genes cromossomais *aaiC* e o gene plasmidial *aatA*. Entretanto, o teste de adesão em cultura de células epiteliais não foi utilizado. Os resultados mostraram que EAEC foi detectada em 68 amostras, sendo o gene *aaiC* o mais prevalente.

Estudos sugeriram três características principais da patogênese da EAEC: (i) abundante aderência a mucosa do intestino e formação de biofilme, (ii) elaboração de enterotoxinas e citotoxinas, e (iii) indução de inflamação da mucosa e secreção intestinal por enterotoxinas e destruição de enterócitos. A adesão de EAEC à mucosa é caracterizada pela presença de um biofilme grosso e agregado, o qual pode promover uma infecção persistente (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO; 2006, CROXEN *et al.* 2013).

Os sintomas associados às infecções de EAEC incluem diarreia aquosa e, ocasionalmente, diarreia mucoide, além de náuseas, anorexia, febre baixa, ruídos intestinais e tenesmo. A diarreia pode ser aguda ou persistente, sendo a diarreia persistente a mais frequente relatada em crianças com menos de um ano (JENSEN *et al.* 2014).

A diversidade dos sintomas clínicos pode ser devido à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de suscetibilidade genética do hospedeiro, assim como à resposta imune (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

2.5 *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

E. coli produtora de toxina Shiga (STEC) são agentes zoonóticos que podem causar doenças fatais em humanos, cujo espectro clínico inclui diarreia, colite hemorrágica (CH) e SHU, caracterizada por insuficiência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia. São de grave preocupação de saúde pública devido à sua associação com grandes surtos e com SHU, que é a principal

causa de insuficiência renal aguda em crianças (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

A infecção frequentemente ocorre por meio do consumo de alimentos ou água, geralmente contaminados por material fecal de ruminantes, principalmente bovinos, os quais são os principais reservatórios de STEC (PERSAD; LEJEUNE, 2014). A maioria das infecções é atribuída ao consumo de carne moída malcozida ou outros produtos derivados da carne, bem como a água, leite não pasteurizado, suco de frutas e vegetais malcozidos, como espinafre (CDC, 2017).

A habilidade das STEC em provocar doenças em humanos é associada principalmente à produção de dois tipos de citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese proteica nas células alvo (PATON; PATON, 1998). Essas toxinas foram inicialmente denominadas verotoxinas (VT) devido à sua atividade citopática irreversível em cultura de células Vero (células de rim de macaco verde africano) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STRAVIC, 1977). A stx1 possui um alto grau de homologia estrutural e funcional com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* 1, e a stx2 possui 60% de homologia (O'BRIEN; LAVECK, 1983). Estão associadas a bacteriófagos lisogênicos, elementos genéticos móveis, os quais, possivelmente, não seriam retidos se não trouxessem vantagem seletiva (WALDOR, 1998).

A produção de uma ou mais toxinas Shiga, isoladamente, não é suficiente para causar doenças, e outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (PATON; PATON, 1998).

Vários subtipos destas duas toxinas (Stx1 a, c, d e Stx2 a, b, c, d, e, f, g) foram descritas com diferentes associações de doenças em seres humanos e propriedades de colonização em bovinos, sendo a Stx2 epidemiologicamente mais associada a doença grave em humanos do que a Stx1 (NEWELL; RAGIONE, 2018).

Essas toxinas apresentam uma subunidade A e cinco subunidades B que se ligam ao glicolípido específico na célula hospedeira: o globotriaosilceramida (Gb3). Em humanos, esses receptores estão presentes principalmente nas células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal. Após internalização, a subunidade A é clivada em duas moléculas, produzindo o fragmento A1 que se liga ao ácido ribonucleico ribossômico 28S (RNAr), isso

resulta na inibição da síntese proteica e na apoptose das células eucarióticas (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é um subtipo de STEC, que além de produzir as toxinas stx1 e stx2, possuem em seu cromossomo a região LEE (*Locus of enterocyte effacement*) e formam a lesão A/E (*attaching and effacing*) como no patotipo de EPEC. É chamada de EHEC com base na síndrome clínica mais frequentemente observada em seres humanos, isto é, CH e diarreia sanguinolenta, seguida da SHU em 10% dos casos (NEWELL; RAGIONE, 2018).

O sorotipo O157:H7 é o mais comum associado a EHEC, sendo o sorogrupo O157 comumente encontrado no gado. Sua prevalência em bovinos de corte nos Estados Unidos varia de 10% a 28% e, a maioria, senão todas as fazendas, tem animais positivos em algum momento (NAYLOR; GALLY; LOW, 2005). Pesquisas também foram realizadas para determinar a prevalência e epidemiologia de STEC não-O157 em ruminantes. Sorogrupos como O26, O103, O111 e O145, com potencial para causar doenças em humanos, foram isolados de bovinos saudáveis (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010). A maioria dos animais que apresentam STEC em seu trato gastrointestinal são assintomáticos, mas algumas cepas podem estar associadas a diarreia em bezerros (FAKIH *et al.* 2017).

Em um estudo epidemiológico realizado por Rangel *et al.* (2005), a *E. coli* O157:H7 foi a responsável por causar, de 1982 a 2002, 350 surtos nos Estados Unidos. A via de transmissão para 183 (52%) dos surtos foi por alimentos, 74 (21%) desconhecida, 50 (14%) pessoa a pessoa, 31 (9%) por água, 11 (3%) contato com animais e 1 (0,3%) relacionado a infecção no laboratório. A carne moída foi responsável por 75 (41%) dos surtos causados por alimentos. Portanto, a saúde pública relacionada a STEC abrange os campos das microbiologias médica, veterinária, alimentar e ambiental.

No estado do Rio de Janeiro, 71% das amostras de fezes de gado leiteiro e de corte saudáveis, apresentaram STEC e o sorotipo O157:H7 foi isolado de duas amostras em gado leiteiro (CERQUEIRA *et al.* 1999). Em Minas Gerais a prevalência de STEC em animais saudáveis foi de: 57,5% (61/106) em cabras, 39,2% (40/102) em bovinos de corte e 17,5% (18/103) em gado leiteiro, com apenas uma cepa O157:H7 isolada de bovinos de corte (OLIVEIRA *et al.* 2008).

Na cidade de La Plata, na Argentina, a porcentagem de amostras positivas para STEC em crianças com diarreia sanguínea e SHU foi de 4,9% e

39,2% respectivamente, sendo o sorotipo O157:H7 o mais frequente. Todas as cepas desse sorotipo possuíam o genótipo *stx2* e *eae* (ODERIZ; LEOTTA; GALLI, 2018). No Brasil, embora cepas de EHEC O157:H7 tenham sido isoladas de pacientes com diarreia sanguinolenta, os casos de SHU relacionados à infecção por EHEC raramente são descritos. Um estudo feito com adultos e crianças no Brasil confirmou o desenvolvimento da imunidade para antígenos de EHEC pela população estudada começando na infância (PALMEIRA *et al.* 2009).

2.6 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

E. coli enterotoxigenica (ETEC) é caracterizada pela produção de enterotoxinas LT (termolábil), ST (termoestável), e pelos fatores de colonização (CFs). Os genes responsáveis pela produção dessas toxinas são encontrados em plasmídios. ETEC pode pertencer a um grande número de sorotipos O:H, mas apenas um número limitado de sorotipos está associado a doenças infecciosas, tais como O8:H9, O6:H16, O78:H12 e O25:H42 e, portanto, são de maior relevância clínica (YAMAMOTO *et al.* 1984; GOMES *et al.* 2016).

ETEC está entre os quatro patógenos (rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* e ETEC) mais associados a diarreia moderada a grave em crianças, de até cinco anos, em países subdesenvolvidos, com estimativas de 280 a 650 milhões de casos relatados para crianças menores de cinco anos e até 800.000 mortes por ano (KOTLOFF *et al.* 2013).

ETEC também é um importante agente causador da diarreia do viajante, associada em 20 a 40% dos casos (NATARO, KAPER, 1998), contudo, pesquisas mais recentes, mostram que EAEC e EPEC também estão frequentemente associadas a diarreia do viajante (LÄÄVERI *et al.* 2016). ETEC também está associada a diarreia neonatal em suínos, bezerros, ovelhas, cães e Síndrome da diarreia pós-desmame (SDPD) em suínos (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

No Brasil, dados epidemiológicos colhidos em diferentes épocas entre 1978 e 2007 demonstraram que a incidência de diarreias induzidas por ETEC variou de 3,5% a 20,5% (GOMES *et al.* 2016).

As toxinas ST são subdivididas em STa (STI) e STb (STII), as quais são codificadas pelos genes *estA* e *estB*, respectivamente. São toxinas de baixo peso

molecular, resistentes ao calor, estáveis a 100 °C durante 15 minutos. A STa é um pequeno peptídeo monomérico que se liga ao receptor transmembranar da guanilato ciclase C, no epitélio intestinal, conduzindo a um aumento de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e subsequente hipersecreção de fluidos, bem como a inibição da absorção de fluido (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

As STa são ainda subdivididas em STaH (codificada pelo gene *estA*), associada com ETEC de humanos, e STaP (codificada pelo gene *st1*), que foi originalmente identificado em ETEC de suínos, mas também é encontrado em isolados humanos e bovinos. A STb é predominante em cepas isoladas de suínos com diarreia, mas raramente são encontradas em cepas isoladas de humanos e bovinos (NATARO; KAPER, 1998, DUBREUIL, 2012).

A LT foi descoberta pela primeira vez em 1967 em isolados de ETEC de suínos e veados, e, em 1971, em isolados de ETEC de humanos. Depois, foram descritos dois tipos de LT, LTI e LTII. Em relação à LTI, podem ser distinguidos dois subtipos: LTh-I (humano) e LTp-I (suínos) (JOBBLING; HOLMES, 2012).

A toxina LT, diferente da ST, possui um alto peso molecular, é inativada pelo aquecimento a 60°C durante 15 minutos e está intimamente relacionada, em estrutura e função, com a toxina da cólera expressa por *Vibrio cholerae*. Esta toxina consiste em uma subunidade A e cinco subunidades B idênticas – servindo, estas, para reconhecer e se ligar ao receptor gangliosídeo GM1 nos enterócitos, sendo a subunidade A a fração tóxica (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

Após a subunidade B se ligar ao receptor GM1, ocorre a endocitose, e a subunidade A sofre translocação através da membrana do vacúolo. A subunidade A tem atividade difosfato de adenosina (ADP)-ribosiltransferase, que transfere a fração ADP-ribose do cofator NAD⁺ para a proteína G, a qual se torna ativa e capaz de estimular a adenilato ciclase, levando a um aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este aumento induz a ativação da proteína quinase A que culmina na fosforilação de canais iônicos. O resultado desta interação é um aumento de secreção de cloro (Cl⁻) e diminuição da absorção de sódio (Na⁺) e cloro, culminando em diarreia aquosa. Além disso, a exposição da toxina estimula a secreção de prostaglandina e a produção de citocinas inflamatórias, resultando em perda de fluido (Gomes *et al.* 2016).

Os mecanismos básicos para a patogênese da ETEC baseiam-se na adesão na mucosa do intestino delgado mediada por fatores de colonização (FC),

que podem ser não fimbrial ou fimbrial, seguido da produção de ST, LT ou ambas. A ação dessas toxinas produz alterações profundas nas células epiteliais, resultando em aumento da secreção de água, Na⁺, Cl⁻ e uma diminuição concomitante da absorção de fluidos, induzindo um desequilíbrio eletrolítico, levando a desidratação e acidose (CROXEN; FINLAY, 2010).

A diarreia produzida por ETEC é aquosa, geralmente sem sangue, muco ou pus. Sintomas como febre e vômitos estão presentes em uma minoria de pacientes. A diarreia pode ser leve, breve e auto-limitante ou pode ser severa, semelhante à observada na infecção por *V. cholerae*. A contaminação fecal das fontes de água e alimentos é o principal motivo da alta incidência de infecção por ETEC nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998; GOMES *et al.* 2016).

2.7 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

E. coli enteroinvasora (EIEC) possui a capacidade de invadir o epitélio do intestino, apresenta propriedades bioquímicas e modo de infecção semelhante à de *Shigella* sp. Caracteristicamente, a maioria das cepas não fermentam lactose, não possuem atividade da lisina descarboxilase e são imóveis, além disso, em alguns casos, EIEC pertence a sorogrupos idênticos aos antígenos típicos de *Shigella*. Numerosos estudos mostraram que *Shigella* e EIEC são taxonomicamente indistinguíveis em nível de espécie (CROXEN; FINLAY, 2010).

A patogênese de EIEC é essencialmente determinada por um grande plasmídeo de virulência de 220kb (pINV), que possui uma região de 32 kb, onde contem 32 genes essenciais para a invasão. Esses 32 genes codificam proteínas de invasão (Ipas) e de disseminação intra e intercelular (IcsA e IcsB); genes (locus Mxi-Spa) codificadores de componentes do sistema de secreção do tipo III (T3SS) – que é introduzido na membrana da célula hospedeira, permitindo que efetores transitem do citoplasma da bactéria para o citoplasma do hospedeiro; chaperoninas (Ipg) e outras proteínas efetoras. O plasmídeo pINV tem sido importante na origem de novos clones de *Shigella*-EIEC (LAN *et al.* 2001).

Para a identificação de EIEC e *Shigella* por métodos moleculares, recomenda-se a investigação do gene *ipaH*, um gene de múltiplas cópias (4-10), que

codifica proteínas envolvidas no processo de invasão (KINGOMBE; CERQUEIRA-CAMPOS; FARBER, 2005).

Vários outros genes de virulência desempenham papéis acessórios no processo patogênico, e são distribuídos em diferentes cepas de *Shigella* e EIEC, os quais codificam toxinas; proteínas que interferem na resposta imune do hospedeiro; fatores que facilitam o processo de colonização e sistemas de captação de ferro, que favorece o crescimento intracelular (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A infecção por EIEC começa no cólon, onde a bactéria atravessa as células M por transcitose para alcançar a submucosa adjacente, que são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas, induzindo a apoptose dessas células. Após o escape, os enterócitos são invadidos através da membrana basolateral, com a ajuda de efetores que são segregados pelo T3SS. Uma vez internalizada, ocorre a lise do vacúolo endocítico e posterior replicação no citoplasma. Para alcançar as células adjacentes, a bactéria induz o crescimento de microfilamentos de actina, culminando na formação de protrusões celulares que são engolfadas pelas células vizinhas, e, então, ocorre a sua disseminação e destruição da monocamada do epitélio intestinal. Embora a EIEC seja invasiva, a disseminação do organismo após a submucosa é rara (SANSONETTI, 2001; GOMES *et al.* 2016).

A infecção causada por EIEC apresenta características clínicas indistinguíveis da causada por *Shigella*, caracterizada por diarreia líquida que precede o aparecimento de fezes disentéricas contendo sangue e muco, cólicas abdominais, náuseas e febre (NATARO; KAPER, 1998; GOMES *et al.*, 2016). Apesar dos sintomas e mecanismos da disenteria bacilar serem semelhantes em infecções causadas por *Shigella* e EIEC, a doença causada pela última apresenta uma forma mais branda e limitada. Em termos de dose infecciosa mínima, 10 a 100 células de *Shigella* são suficientes para causar diarreia em seres humanos. Em contrapartida, a EIEC exige uma dose infecciosa maior, até 10^6 células ou mais, para causar doença em seres humanos (KINGOMBE; CERQUEIRA-CAMPOS; FARBER, 2005).

Os dados epidemiológicos de EIEC podem ser subestimados devido à dificuldade de diferenciação entre *Shigella*. São descritas principalmente em surtos geralmente transmitidos por água ou alimentos, embora a transmissão de pessoa a pessoa também ocorra. Casos esporádicos endêmicos em países subdesenvolvidos

ocorrem geralmente onde *Shigella* spp. também estão prevalentes (NATARO; KAPER, 1998).

A incidência da EIEC em países desenvolvidos é baixa, mas surtos ocasionais por alimentos podem ocorrer. Em 1985, por exemplo, 370 pessoas contraíram diarreia por EIEC após comerem em um restaurante do Texas, nos Estados Unidos (GORDILLO *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento de casos de infecções por EIEC na Europa. Na Itália, em 2012, foi relatado um grande surto de diarreia sanguinolenta associado a EIEC, envolvendo mais de 100 casos. Em 2013, ocorreu um caso esporádico de diarreia do viajante por EIEC, na Espanha. Em 2014, ocorreu um surto de doença gastrointestinal em East Midlands no Reino Unido, envolvendo 50 pessoas, sendo associado ao consumo de vegetais contaminados. Um clone altamente virulento de EIEC O96:H19 foi envolvido em todos os casos apresentados, demonstrando uma possível emergência de novos clones de EIEC, causando surtos de infecções no futuro (MICHELACCI *et al.* 2016).

2.8 *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC)

O grupo das DAEC é caracterizado pelo padrão de aderência difusa (AD) nas células HeLa ou HEP-2, onde as bactérias aderem de forma difusa por toda superfície da célula. Esse patotipo é considerado um grupo heterogêneo, sendo o padrão AD o único fenótipo comum a todos os isolados (CROXEN; FINLAY, 2010).

Em 1989, Bilge *et al.*, identificaram a cepa protótipo C1845 (075:NM) de DAEC, isolada das fezes de criança com diarreia persistente. Posteriormente, Girón *et al.* (1991) identificaram vários enteropatógenos durante um surto de diarreia infantil numa aldeia Maia no México, e apenas isolados de *E. coli* com padrão AD foram estatisticamente associados à diarreia, sendo, pela primeira vez, designados *E. coli* de aderência difusa (DAEC).

DAEC foi implicado como causa de diarreia em vários estudos, particularmente em crianças maiores de 12 meses de idade, mas sua participação na diarreia ainda é incerta, pois em alguns estudos são encontradas em frequências similares em casos de diarreia e controles assintomáticos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de DAEC isoladas de crianças e adultos parecem representar duas populações distintas de bactérias. A diferença observada entre estudos epidemiológicos pode ser explicada pela suscetibilidade à diarreia dependente de idade (MANSAN-ALMEIDA; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013).

Aproximadamente 75% das DAEC possuem adesinas da família Afa/Dr, responsáveis por este fenótipo de adesão, e são encontradas associadas à infecção do trato urinário e à infecção entérica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As adesinas pertencentes à família Dr reconhecem o antígeno de grupo sanguíneo Dr, presente na molécula de fator de aceleração de decomposição (DAF ou CD55), e algumas delas também reconhecem moléculas de adesão celular relacionadas ao antígeno carcinoembrionário (CEACAM) como receptores. Após o reconhecimento dos receptores ligados à membrana, pelas adesinas Afa/Dr, a ativação de caminhos de transdução de sinal leva a lesões estruturais e funcionais, promovendo o desmantelamento da rede de actina em células intestinais. As lesões estruturais e funcionais induzidas pelas DAEC incluem perda das microvilosidades e diminuição em expressão e atividades enzimáticas das proteínas funcionais associadas à borda em escova (SERVIN, 2005).

No cenário brasileiro da microbiologia, estudos com amostras de água para o consumo humano são escassos. Com efeito, tal lacuna obsta os aprofundamentos necessários acerca do quanto infecções em humanos são advindas de água própria para consumo. Assim, chega-se à importância da realização deste trabalho, no qual foram investigadas a ocorrência e as características de virulência de DEC presente em amostras de água destinadas ao consumo humano provindas de fontes alternativas, tais como poços rasos e minas, na região Norte do Paraná.

3 REFERÊNCIAS

- ADEFISOYE, M. A.; OKOH, A. I. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. **Microbiology Open**, v.5, n.1, p 143–151, 2016.
- ALONSO, C. A. *et al.* Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. **Veterinary Microbiology**, v. 207, p. 69–73. 2017.
- ANA – Agência Nacional de Águas. **Panorama da qualidade das águas subterrâneas no Brasil**. Brasília: ANA, 2005. 73p.
- ANDRADE, I.G. *et al.* Improved sanitation and income are associated with decreased rates of hospitalization for diarrhoea in Brazilian infants. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, n. 5, p. 506–511, 2009.
- ANDRADE, F. B., GOMES, T. A. T., ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 16–18, 2014.
- ARAUJO, J. M. *et al.* Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n.10, p. 3396–3399. 2007.
- BEZERRA, W.G.A. *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella ser. Saintpaul* natural co-infection in a free-living ruddy ground dove (*Columbina talpacoti*): a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n.5, p.1236–1242, 2017.
- BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, n. 9, p. 671–676, 2011.
- BILGE, S. *et al.* Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 8, p. 4281-4289, 1989.
- BORGES, C.A. *et al.* Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 344–348, 2017.
- BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 dez. 2011.
- CAMPOS, L. C; FRANZOLIN M. R; TRABULSI L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, 2004.

CANATA, M. G. *et al.* Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. **Pediatría. (Asunción)**, v.43, n.1, p.13–17, 2016.

CARBONARI, C. C. *et al.* First isolation of enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 from a diarrhea case in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 4, p. 302–306, 2014.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. **Shiga Toxin-Producing *E. coli* & Food Safety** (2017). Disponível em: <
<https://www.cdc.gov/features/ecoliinfection/index.html>> acesso em: 28 jan 2018.

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

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, 2005.

CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71–87, 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

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

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

COSTA, C. F. M. *et al.* Enterobacteria identification and detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in a Port Complex. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.3, p. 945–952, 2014.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Review Microbiology**, v.8, n.1, p. 26–38, 2010.

de CAMPOS, A. C. L. P. *et al.* Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 2, p. 94–100, 2017.

DIAS, R. C. B. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children

living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.124, p. 299–308, 2016.

DONNENBERG M. S. *et al.* Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 1412–1417, 1993.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends in Microbiology**, v. 5, n.3 p. 109–114, 1997.

DUBREUIL, J. D. ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v.7, n.1, 2016.

DUBREUIL, J.D. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. **Current Issues in Molecular Biology**, v.14, n.2, p. 71–82, 2012.

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267–1282, 2006.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 281-298, 2012.

FAKIH, I. *et al.* Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. **Veterinary Microbiology**, v. 202, p.16–22, 2017.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11 ed. St. Louis: Mosby, 2002.

FRANK, C. *et al.* Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **The New England Journal of medicine**, v. 365, n.19, p. 1771–1780, 2011.

FRANZOLIN, M.R. *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.4, p.359–363. 2005.

GAYTÁN, M. O. *et al.* Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n. 129, 2016.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032. p. 710–713, 1991.

GIRÓN, J. A. *et al.* Diffuse adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 507–513, 1991.

- GOMES, T.A.T. *et al.* Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 331–337, 1991.
- GOMES, T.A.T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47. n. 1. p. 3–30, 2016.
- GORDILLO, M. E. *et al.* Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 889–893, 1992.
- GORDON, D. M. *et al.* Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, 2008.
- HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.
- HAVT, A. *et al.* Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p. 98–105, 2017.
- HAZEN, T.H. *et al.* Comparative genomics provides insight into the diversity of the attaching and effacing *Escherichia coli* virulence plasmids. **Infection and Immunity**, v.83, n.10, p. 4103–4117, 2015.
- HEDBERG, C.W. *et al.* An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n.6, p.1625–1628, 1997.
- HELLER, L.; PÁDUA, V. L. **Abastecimento de água para consumo humano**. 2^o ed. Minas Gerais: UFMG, 2010
- HIRATA, R.; CONICELLI, B. P. Groundwater resources in Brazil: a review of possible impacts caused by climate change. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, n.2, p.297–312, 2012.
- HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 8. p. 729–734, 2015.
- HUANG, D.B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n.5, p. 556–563, 2006.
- ISHII, S.; MEYER, K.P.; SADOWSKY, M.J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n.18, p. 5703–5710, 2007.
- ITOH, Y. *et al.* Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2546–2550, 1997.

- JENKINS, C. *et al.* Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1493–1497, 2006.
- JENSEN, B. H. *et al.* Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.
- JOBLING, M. G.; HOLMES, R.K. Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse *Escherichia coli* isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. **PLoS one**, v. 7, n.1, 2012.
- JØNSSON, R. *et al.* Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p.1396–1405, 2015.
- KAHALI, S. *et al.* Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4111–4120, 2004.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p.123–140, 2004.
- KAPER, J.B. Defining EPEC. Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 130 –133,1996.
- KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 360–370, 2010.
- KINGOMBE, C. I.; CERQUEIRA-CAMPOS, M.L.; FARBER, J. M. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 239 – 245, 2005.
- KNUTTON, S. *et al.* Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.33, n.1, p. 32–40, 2001.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 775–779, 1977.
- KOO, H.L. *et al.* Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, n. 2, p.218–221, 2008.
- KOTLOFF, K.L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p.209–222, 2013.
- LÄÄVERI, T. *et al.* A: Prospective study of pathogens in asymptomatic travellers and those with diarrhoea: aetiological agents revisited. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 6, p. 535- 541, 2016.

- LAN, R. *et al.* Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6303–6309, 2001.
- LAW, R.J. *et al.* In Vitro and In Vivo Model Systems for Studying Enteropathogenic *Escherichia coli* Infections. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.3, n.3, 2013.
- LEVINE, M. M. *et al.* *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **The Lancet**, v. 27, p. 1119–1122, 1978.
- LEVINE, M. M.; R. EDELMAN. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, v. 6, p. 31–51, 1984.
- LIBERATORE, A. M. A. *et al.* Expression of aggregative adherence to hela cells by *Escherichia coli* strains isolated from sick horses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.9–13, 2007.
- LIMA, A. A. *et al.* Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica**, v. 381, p. 39–44, 1992.
- LIMA, I. F. *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 62, p. 683–693, 2013.
- LOSCH, L. S. *et al.* Detección de genes de virulencia del patotipo enteroagregativo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua subterránea de la provincia del Chaco, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.47, n.2, p. 88–94, 2015.
- MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 22, p. 1471-2180, 2013.
- MARTINS, F. H. *et al.* Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 196, p. 72–77, 2016.
- McDANIEL, T. K. *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n.5, p. 1664–1668, 1995.
- McDANIEL, T.K.; KAPER J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v.23, n.2, p. 399–407, 1997.
- MICHELACCI, V. *et al.* Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, 2016.

- MOON, H. W. *et al.* Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, 1983.
- MORIN, N. *et al.* Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 122–132, 2013.
- MOURA, R. A., *et al.* Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. :7399–7408, 2009.
- NAOKO, I. *et al.* Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolates from Japan Reveals Emergence of CTX-M-14-Producing EAEC O25:H4 Clones Related to Sequence Type 131. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2128–2134, 2016.
- NATARO J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142–201, 1998.
- NATARO, J.P. *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2297–2304, 1992.
- NATARO, J.P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, 1987.
- NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: Emerging Infections. Washington, D.C.: **American Society for Microbiology Press**, 2003.
- NETER, E. *et al.* Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801–808, 1955.
- NEWELL, D. G.; LA RAGIONE, R. M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? **Transboundary and Emerging Diseases**. p. 1– 23, 2018.
- NAYLOR, S.W.; GALLY, D.L.; LOW J.C. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, n. 6-7, p. 419–441, 2005.
- O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.40, n. 2, p. 675–683, 1983.
- OCHOA, T. J. *et al.* New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.9, p. 852– 856, 2008.
- ODERIZ, S.; LEOTTA, G. A.; GALLI, L. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children treated at an inter-zonal pediatric hospital in the city of La Plata. **Revista Argentina de Microbiología**, 2018.

- OLIVEIRA, M.G. *et al.* Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p.139–146, 2008.
- ORDEN, José A. *et al.* Ruminants are not a reservoir of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v.49, n.1, p.25–26, 2017.
- PALMEIRA, P. *et al.* Acquisition of serum antibodies reactive with enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence-associated factors by healthy Brazilian children and adults. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 12, p. 1089–1094, 2009.
- PARK, J. *et al.* A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 66, p. 45–50, 2018.
- PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450–479, 1998.
- PEARSON, J. S. *et al.* The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. **Annual Review of Genetics**, v. 50, p. 493–513, 2016.
- PERSAD, A. K.; LEJEUNE, J. T. Animal reservoirs of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 211–230, 2014.
- PRÜSS-ÜSTÜN, A. *et al.* **Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health.** World Health Organization, Geneva. 2008.
- RANGEL, J.M. *et al.* Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 603–609, 2005.
- SANCHES, L.A. *et al.* Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 760–763, 2017.
- SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 25, n.1, p. 3–14, 2001.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n.2, p. 264 – 292, 2005.
- SOUZA, C. O. *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79–91, 2016
- STEVENS, M. P.; FRANKEL, G. M. The locus of enterocyte effacement and other associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Sperandio, V.; Hovde, C.J. (eds) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **American society for Microbiology Press**, Washington, DC, p. 97–130, 2015.

SUSAN, M. H. *et al.* Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, 2002.

USEPA - United States Environmental Protection Agency –. **Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: enterococci and *Escherichia coli***. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, 2000.

VASUDEVAN, P. *et al.* Behavior of enteroaggregative *Escherichia coli* in bottled spring and mineral water. **Journal of Food Protection**, v. 66, n.3, p. 497–500, 2003.

VIJAY, D. *et al.* Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, p. 21–31, 2015.

WALDOR, M. K. Bacteriophage biology and bacterial virulence. **Trends Microbiology**, v.6, n. 8, p. 295–297, 1998.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4^oed. Geneva, 2011.

WHO/UNICEF. **Progress on sanitation and drinking water: 2015 update and MDG assessment**. 2015. Disponível em: <http://files.unicef.org/publications/files/Progress_on_Sanitation_and_Drinking_Water_2015_Update_.pdf> Acesso em: 22 jan 2018.

WILSON, A. *et al.* Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. **European Journal of Epidemiology**, v. 17, n. 12, p. 1125–1130, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report**, Geneva, 2000.

YAMAMOTO, T. *et al.* A virulence plasmid in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans: intergenetic transfer and expression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 150, n. 5, p. 688– 698, 1984.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar a qualidade microbiológica de água subterrânea utilizada para consumo humano na região norte do Paraná e investigar a prevalência de DEC através da caracterização genotípica e fenotípica dos fatores de virulência isolados de *E. coli*.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica da água *in natura*, proveniente de minas e poços rasos;
- Determinar a prevalência de DEC através da detecção dos genes de fatores de virulência pela PCR;
- Determinar os sorotipos O e H;
- Classificar os grupos filogenéticos;
- Caracterizar o padrão de adesão às células epiteliais HEp-2;
- Verificar a formação de biofilme;
- Analisar a citotoxicidade em cepas STEC;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

5 TRABALHO CIENTÍFICO

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* diarreioagênica isoladas de água subterrânea em áreas rurais no Sul do Brasil.

DEC em água subterrânea

Caroline Rodrigues da Silva¹, Matheus Silva Sanches¹, Kawana Hiromori Macedo¹, Angélica Marim Lopes Dambrozio¹, Sergio Paulo Dejato da Rocha¹, Armando Navarro², Jacinta Sanchez Pelayo¹.

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa postal 10011, 86 057 – 970 Londrina, PR, Brasil

²Departamento de Saúde Pública, Universidade Nacional Autônoma do México, Cidade Universitária, DF, México.

RESUMO

As doenças transmitidas pela água, como as gastroenterites causadas por *Escherichia coli* diarreioagênica (DEC), são um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Este trabalho teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica de água para consumo humano de minas e poços rasos e caracterizar genotípica e fenotipicamente as cepas de DEC. Das 210 amostras estudadas, 153 (72,9%) apresentaram coliformes totais e 96 (45,7%) *E. coli* e dessas, 27 (28,1%) apresentavam DEC: 48,1% *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), 29,6% *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 14,8% *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 3,7% *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e 3,7% *E. coli* enteroinvasora (EIEC). Todas as STEC produziram efeito citotóxico em células Vero e 14,8% das DEC foram resistentes a um dos antibióticos testados. Todas as DEC formaram biofilme em células HEp-2 e 92,6% foram aderentes, com prevalência a adesão agregativa (74%). Foram encontrados 25 sorotipos diferentes e um isolado de EPEC apresentou o sorotipo O44037:H7, pela primeira vez relatado no Brasil. Em relação ao filogruppo, 63% pertenciam ao B1. As águas analisadas são potenciais reservatórios de DEC, podendo atuar como fonte de infecção para humanos. Medidas de prevenção devem ser adotadas, evitando assim, essas contaminações.

Palavras-chave: Água para consumo, Água subterrânea, *Escherichia coli*, DEC.

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas pela água são um dos principais problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. Estima-se que a água contaminada tenha causado mais de 20 milhões de óbitos, dos quais mais de 80% foram em crianças menores de cinco anos (Prüss-Üstün *et al.* 2008).

Embora o número total de óbitos atribuíveis à diarreia diminuiu substancialmente entre 1990 a 2012, a falta de acesso a água potável, saneamento e higiene adequada ainda representam mais de mil mortes de crianças por dia em todo o mundo e, apesar das reduções na mortalidade, a morbidade atribuível à diarreia permanece inalterada em cerca de 1,7 bilhões de casos por ano (Chakravarty *et al.* 2017).

Entre os vários poluentes da água potável, a microbiana foi considerada uma das ameaças mais sérias para a saúde pública. A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) recomenda o uso de *Escherichia coli* como organismo indicador de contaminação fecal de seres humanos ou de outros animais endotérmicos, e também um indicador potencial de presença de organismos patogênicos (USEPA, 2017).

E. coli diarreiogênica (DEC) é um dos principais grupos de agentes etiológicos de infecções intestinais, ademais são responsáveis por até 40% dos episódios de diarreia aguda em crianças de países em desenvolvimento (Miliwebsky *et al.* 2016). Esse grupo também desempenha um papel considerável como causa de diarreia no Brasil, tanto em crianças como em adultos (Spano, *et al.* 2017).

As DEC estão agrupadas em oito categorias classificadas 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. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC), *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) e, ainda, a subcategoria de STEC: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Clements *et al.*, 2012).

A transmissão de DEC segue um processo fecal-oral através de fontes contaminadas, como alimentos e água, que já foram descritas como fontes potenciais desses patógenos, o que poderia resultar em infecções humanas após o consumo, além de estar envolvidas em surtos de diarreia transmitidos por água (Park *et al.* 2018).

As águas subterrâneas constituem um importante recurso natural no Brasil, 30 a 40% da população utilizam esse tipo de água para o consumo (ANA 2010).

As alternativas de extração de águas subterrâneas, como minas e poços rasos, em função da sua menor profundidade, estão mais suscetíveis à contaminação por esgotos sanitários domésticos e na maioria das vezes, são empregadas para abastecimentos individuais na zona rural, sendo um risco à saúde dessa população (WHO, 2011).

Portanto, este estudo teve como objetivo: avaliar os parâmetros microbiológicos das águas subterrâneas *in natura* utilizadas para consumo humano provenientes de minas e poços rasos no Sul do Brasil e caracterizar genotípica e fenotipicamente as DEC isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram coletadas 210 amostras de água para consumo humano, *in natura*, provenientes de poços rasos e minas localizadas em áreas rurais no norte do estado do Paraná, sul do Brasil, no período de maio a agosto de 2017.

As amostras coletadas em frascos de vidro estéreis, de 500 mL, foram transportadas em caixas isotérmicas, resfriadas com gelo reciclável e mantidas a 4°C até o início das análises, o qual não excedia 6 horas.

ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI*

A técnica utilizada para detecção e quantificação de coliformes totais e *E. coli* foi a do substrato cromogênico ONPG-MUG Colilert (IDEXX *Laboratories*, SOVEREIGN–USA), aprovado pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2017), como descrito por Schuroff *et al.* (2014).

Após a incubação das cartelas Quanti-Tray (WP2000), as estimativas quantitativas de Numero Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante.

Para o isolamento de *E. coli* as cartelas que apresentaram poços amarelos e adquiriram coloração azul-fluorescente, frente a luz UV, foram semeadas em ágar MacConkey (Difco[®], USA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, 3 a 5 colônias, de cada placa, com características presuntivas de *E. coli*, foram submetidas à identificação bioquímica, com a utilização dos meios EPM, MILi e Citrato de Simmons (PROBAC, BR). Os isolados bioquimicamente identificados como *E. coli* foram armazenados a -80°C em caldo infusão de coração e cérebro (BHI; Difco) com 20% (v/v) de glicerol (Sigma, USA).

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE DEC

Previamente o DNA foi extraído por método de fervura conforme descrito por Lascowski *et al.* (2012), e, posteriormente, os sobrenadantes foram utilizados para o diagnóstico de DEC e identificação de grupos filogenéticos.

Um total de 370 isolados de *E. coli*, obtido a partir de 96 amostras de água positivas para *E. coli*, foram analisadas para identificação das DEC. Os genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram utilizados para identificação de STEC/EHEC, *eae* e *bfp* para EPEC típica (EPECT) e atípica (EPECa), *ST-1a*, *ST-1b* e *elt* para ETEC, *ipaH* para EIEC, *aatA*, *aggR*, *aaiA* e *aaiC* para EAEC típica (EAECT) e atípica (EAECa) (Tabela 1).

Os ensaios foram realizados em um termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA).

Cada reação de amplificação do DNA bacteriano continha 2 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[™]), tampão de reação 1X e água Milli-Q (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL.

Foram utilizados 7 µL do produto amplificado para observação em eletroforese em gel de agarose (Invitrogen[™]) 1,5% - 2%, preparada em tampão Tris Borato EDTA (TBE). Na corrida eletroforética, foi utilizado um marcador de tamanho molecular de 100pb Ladder (Invitrogen[™]). Os géis foram corados com a solução SYBR SAFE (Invitrogen[™]) e observados em transluminador com luz ultravioleta (Vilbert Loumart, France).

Os controles positivos usados foram: EHEC EDL933 para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*; EPEC E2348/69 para *eae* e *bfpA*; EAEC 042 para *aaiA*, *aaiC*, *aatA* e *aggR*; ETEC H10407 para *ST-Ia* e *elt*; 4083 para *ST-Ib* e EIEC EDL1284 para *ipaH*.

DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *E. COLI*

As cepas positivas para a presença de genes de virulência de DEC foram testadas para os genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2, por meio de uma PCR, para caracterização em grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F, de acordo com Clermont *et al.* (2013).

SOROTIPAGEM

A sorotipagem de DEC foi realizada por microaglutinação (Navarro *et al.* 2016), que foram feitas em placas de 96 poços, utilizando soros de coelho contra antígenos somáticos (O1 a O187) e flagelar (H1 a H53) de *E. coli* e de 46 antígenos somáticos de *Shigella*.

TESTE DE ADESÃO EM CÉLULAS HEP-2

Os isolados de DEC foram testados para aderência em células HEP-2 de acordo com a técnica descrita por Cravioto *et al.* (1979). Os ensaios foram realizados em 6 horas de interação bactéria-célula e observados em microscópio óptico.

TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação do biofilme foi avaliada pelo método descrito por Wakimoto *et al.* (2004). A formação de biofilme foi considerada quando o valor da densidade óptica a 570 nm (OD₅₇₀) foi acima de 0,2. A cepa EAEC 042 foi utilizada como controle positivo e a *E. coli* HB101 (*E. coli* K-12) como controle negativo.

TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As amostras foram submetidas ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco difusão conforme descrito pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Os antimicrobianos (Oxoid™) utilizados foram: Ampicilina (AMP) 10 µg, Cefoxitina (CFO) 30 µg, Cefalotina (CFL) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, Ácido Nalidixico (NAL) 30 µg, Piperacilina-tazobactam (PPT) 100/10µg, Ampicilina-Sulbactam (ASB) 10/10 µg, Amicacina (AMI) 30µg, Gentamicina (GEN) 10µg e Cloranfenicol (CLO) 30µg.

CITOTOXICIDADE DE STEC EM CÉLULAS VERO

A produção de toxina Stx pelos isolados de STEC foi verificada por meio do ensaio de citotoxicidade em células Vero, conforme descrito previamente por Beutin *et al.* (2002), com modificações. Sobrenadantes das cepas de *E. coli* EDL933 e *E. coli* HB101 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

A citotoxicidade dos isolados foi quantificada após a análise da atividade metabólica das células pelo ensaio de MTT (brometo de 3 – [4,5-dimetil-tiazol-2-il] - 2,5- difenil- tetrazólio), que avalia a metabolização de sais de tetrazolium por mitocôndrias de células viáveis, de acordo com Murakami *et al.* (2000). A absorbância foi medida por espectrofotometria a 570 nm em leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems). O percentual de citotoxicidade foi determinado pela fórmula $1 - (A_{amostra}/A_{controle-}) \times 100$. O isolado foi considerado citotóxico quando atingido um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle.

RESULTADOS

PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E *E. COLI*

Das 210 amostras de água coletadas de minas e poços rasos, 72,9% (153/210) estavam contaminadas por coliformes totais e 45,7% (96/210) por *E. coli*. Das 96 amostras positivas para *E. coli*, 370 isolados foram obtidos e pesquisados quanto a presença de genes que caracterizam DEC.

IDENTIFICAÇÃO DE DEC

Das 96 amostras positivas para *E. coli*, DEC estava presente em 28,1%, sendo que dessas, 48,1% apresentaram isolados com características genotípicas de STEC (*eae* - e *stx* +), sendo que 92,3% foram positivos para *stx2* e 7,7% para *stx1*. As outras DEC encontradas foram: 11,1% EAECt (*aggR*+), 18,5% EAECa (*aaiA*+ e *aggR*-), 3,7% EPECt (*eae*+ e *bfp*+), 11,1% EPECa (*eae*+ e *bfp*-), 3,7% ETEC (*STI-a*+), e 3,7 % para EIEC (*ipaH*+) (Tabela 2).

CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

Dos 27 isolados de DEC, 63% foram classificados no filogrupo B1, 18,5% no filogrupo C, 11,1% no filogrupo B2 e 7,4% no filogrupo E. Dos 13 isolados de STEC, 61,5% pertenciam ao filogrupo B1, 15,4% ao C, 15,4% ao E e 7,7% ao B2. Nenhum dos isolados pertenciam ao filogrupo A, D e F (Tabela 2).

SOROTIPAGEM

Entre os 27 isolados de DEC, foram encontrados 25 sorotipos diferentes, sendo que duas cepas compartilharam o mesmo sorotipo O64474:H2, encontrado em isolados de EAECt, e outras duas cepas que compartilharam o sorotipo O91:H21 (STEC e EAECa) (Tabela 2).

Em EPECa encontramos os sorotipos: O44037:H7, O145:H34, O109:H21 e, em EPECt: O132:H34. Em STEC: O103:H7, O185:H16, O4:H12, O73:H12, O103:H16, O139:H7, O91:H10, O150:H8, O49:H49, O6:H49, O91:H21, O64474:H12 e O107:HNT. Em EAECt: O64474:H2 e O8:H48, EAECa: O69:H-, O48:H21, O88:HNT, O91:H21, O140:H21, e nos únicos isolados de ETEC e EIEC: O150:H20 e O93:H20 respectivamente.

ADERÊNCIA EM CÉLULAS HEP-2

Dos 27 isolados de DEC, 92,6% foram aderentes. Dos 13 isolados de STEC, 69,2% apresentaram adesão agregativa (AA), 15,4% não aderentes (NA), 7,7% adesão difusa (AD) e 7,7% não caracterizada. Todas as EAEC e os isolados de EIEC e ETEC apresentaram o padrão AA. Das três EPECa isoladas, 33,3%

apresentou adesão em cordões (CLA, *chain-like adherence*) e 66,7% localizada-like (ALL). A cepa de EPECt apresentou um padrão de adesão misto de localizada com agregativa (AL/AA).

FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme (O.D 570 > 0.2) foi identificada em todos os isolados de DEC. Dados apresentados no Gráfico 1.

SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade a 10 antibióticos foi examinada nos 27 isolados de DEC. Destes, 85,2% não apresentaram resistência aos antibióticos testados, ao passo que 14,8% foram resistentes a um dos antibióticos. Dois isolados (7,4%) foram resistentes a piperacilina-tazobactam, um (3,7%) à cefoxitina e um (3,7%) apresentou resistência intermediária à cefoxitina.

EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS VERO

Todos os sobrenadantes dos isolados de STEC produziram efeito citotóxico em células Vero, que apresentaram uma atividade citotóxica de 51,9 % a 69,8% (Gráfico 2).

DISCUSSÃO

A identificação de microrganismos de origem fecal nas águas destinadas ao consumo é necessária para reduzir o potencial de contato entre humanos e patógenos entéricos, no qual a *E. coli* é o microrganismo mais utilizado como indicador de contaminação fecal recente (WHO, 2011). Nossos resultados mostraram que 72,9% das amostras analisadas estavam impróprias para o consumo humano, de acordo com a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde que estabelece que a água potável não deve apresentar coliformes totais e *E. coli* (Brasil, 2011). Geralmente a contaminação das águas subterrâneas está relacionada com o uso do solo, tais como pecuária e sistemas sépticos domésticos. Para evitar uma maior contaminação e mitigar riscos à saúde humana, ações de gerenciamento adequadas podem ser implementadas (Gambero *et al.* 2017).

Trabalhos epidemiológicos envolvendo isolados de DEC em água para consumo humano são escassos no Brasil. No presente trabalho, cinco patótipos de DEC foram encontrados, sendo que STEC portadoras do gene *stx2* foram as mais prevalentes.

Lascowski *et al.* (2013) pesquisando STEC em amostras de água para consumo, na mesma região no norte do Paraná, Brasil, verificaram que das 12 cepas de STEC isoladas, 10 apresentavam o gene *stx2* (88,3%). Outro estudo realizado por Schuroff *et al.* (2014) nessa mesma região pesquisando EPEC e STEC em amostras de lodo de decantador e água de lavagem de filtros de duas estações de tratamento de água, encontram 2,9% de EPEC e 4,7% de STEC, mostrando assim, que STEC é um patótipo encontrado com frequência nessa região.

Todas as cepas de STEC isoladas nesse trabalho foram citotóxicas em células Vero. Considerando que a toxina Stx2 está epidemiologicamente mais associada a doença grave em humanos do que a Stx1 e que as toxinas Stxs provocam danos graves às células endoteliais podendo levar a colite hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítico Urêmica (SHU), as STEC constituem uma preocupação significativa para a saúde pública (Mohawk & O'brien, 2011).

EPEC, EHEC e EAEC foram associadas a surtos de gastroenterite pelo consumo de água subterrânea na Coréia do Sul (Park *et al.* 2018), sendo que em nosso estudo, EAECa foi o segundo patótipo mais prevalente. Ainda, um estudo realizado na capital do Zimbábue, sul da África, mostrou que 63% das amostras de água potável estavam contaminadas por *E. coli*, e de todas as DEC pesquisadas, apenas EAEC portando o gene *aaiC* foi encontrada (Navab-Daneshmand *et al.* 2018).

Um estudo realizado por Assis *et al.* (2014), também no Paraná, mostrou que das DEC isoladas em pacientes com diarreia, a EPECa foi o patótipo mais encontrado, e em nosso estudo, esse patótipo foi o terceiro mais prevalente, mostrando que a água pode ser uma fonte de contaminação de EPECa para o homem.

Kambire *et al.* (2017), na Costa do Marfim, detectou que 68% das cepas de *E. coli* isoladas de água pertenciam ao grupo das DEC, sendo que 90% eram ETEC, diferente dos resultados encontrados em nosso estudo, onde a prevalência de ETEC foi bem mais baixa (1%). Huang *et al.* (2012) encontraram 29,1% de DEC

em estações de tratamento de água em Taiwan, sendo que ETEC não foi encontrada.

Assim a detecção de genes de DEC em água potável destaca o potencial risco de transmissibilidade ambiental dessas cepas patogênicas em várias partes do mundo.

A atribuição de isolados de *E. coli* a um grupo filogenético fornecem provas de que as cepas de vários filogrupos diferem em suas características fenotípicas e genotípicas, em nicho ecológico e em ancestralidade e capacidade de causar doença. Desse modo, as análises de grupos filogenéticos, juntamente com a detecção de genes de fatores de virulência, podem constituir uma ferramenta útil para prever possíveis riscos para a saúde associados às cepas de *E. coli* encontradas no ambiente (Ishii *et al.* 2007).

Em nosso estudo, o filogrupo B1 foi o mais prevalente (62,96%). Walk *et al.* (2007) demonstraram que a maioria das cepas de *E. coli*, que podem persistir no ambiente, pertencem a esse filogrupo, estando em consonância com nosso estudo.

Duriez *et al.* (2001) sugerem que as cepas dos grupos filogenéticos A, B1 e D predominam na microbiota intestinal, e que essas cepas devem adquirir fatores de virulência para se tornarem patogênicas. Em contraste, as cepas pertencentes ao filogrupo B2 são raras, mas parecem ser potencialmente virulentas e são frequentemente mais isoladas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (Mereghetti *et al.* 2002). No nosso estudo, cepas B2 ocorreram em uma frequência muito menor que B1, estando em concordância com esses estudos.

O filogrupo C foi o segundo mais prevalente em nossos isolados, sendo esse filogrupo um dos menos frequentes. Esse filogrupo foi proposto por conter cepas estreitamente relacionadas e distintas do filogrupo B1 (Clermont *et al.* 2013). Portanto, conclui-se que as cepas de DEC isoladas de água subterrânea constituem uma população geneticamente heterogênea.

Foram encontrados 25 sorotipos diferentes, incluindo os sorotipos O64474:H2, O64474:H12 e O4403:H7 que compartilham o antígeno O com *Shigella boydii* 16 (Navarro *et al.*, 2010) e *S. boydii* 18 (Navarro *et al.* 2016), respectivamente.

O sorogrupo O64474 foi descrito pela primeira vez por Navarro *et al.* (2010) em isolados de ETEC associados a diarreia em crianças no Egito, Bangladesh e México, entre 1980 e 2007, distribuídas entre os antígenos flagelares H2, H10, H12 e H34. No Brasil, recentemente, o sorotipo O64474:H8 foi encontrado

em *E. coli* com genes de ExPEC isolado de queijo (de Campos *et al.* 2017). Em nosso trabalho dois isolados de EAECt apresentaram o sorotipo O64474:H2 e uma STEC, o O64474:H12. Esses estudos mostram que o sorogrupo O64474 pode ser encontrado tanto em DEC como em *E. coli* com genes de ExPEC.

O sorogrupo 44037 também foi descrito por Navarro *et al.*, (2016) em um estudo com 23 cepas de *E. coli* isoladas de fezes de crianças e gado, para caracterização do antígeno somático e a sorotipagem foi realizada com 187 antígenos O e 53 antígenos H de *E. coli* e para 46 antígenos O de *Shigella*. As 23 cepas mostraram reação apenas para os antígenos O de *S. boydii* 18. Assim sugeriram um novo sorogrupo de *E. coli*, O44037, com pelo menos 5 sorotipos (H2, H3, H9, H16 e H48), com algumas características de ETEC. Em nosso estudo um isolado de EPECa apresentou o sorotipo 44037:H7, sendo o primeiro relato no Brasil.

Essa relação entre antígenos de *Shigella* e *E. coli* é relatada por diversos autores, como Liu *et al.* (2008), que encontraram 21 antígenos O de *Shigella* idênticos ou estreitamente relacionados àqueles encontrados em *E. coli*.

Mais de 380 sorotipos O:H já foram descritos para STEC, mas apenas um número limitado está associado à doença em humanos. O sorogrupo O103 está entre os clássicos (Karmali *et al.* 2010) e foi encontrado em duas cepas de STEC nesse estudo. No entanto, o antígeno H2 é o mais encontrado relacionado ao O103 (Park *et al.*, 2018) e não foi identificado no presente trabalho, confirmando a heterogeneidade dentro desse patotipo.

Também encontramos duas cepas de STEC com os sorotipos O91:H21 e O91:H10, na literatura esse sorotipo está mais associado à STEC que causam SHU, no entanto, nós encontramos esse sorotipo em uma cepa de EAECa. A presença dos genes *stx2* e *eae* tem sido um preditor confiável na capacidade das cepas de causar SHU, mas algumas cepas de *E. coli*, como as dos sorotipos O91:H21/H10, não possuem *eae*, mas tem a capacidade de causar essa síndrome. Na Alemanha, a STEC do sorogrupo O91 é o mais prevalente em pacientes adultos e o segundo mais isolado em amostras de alimentos (Mellmann *et al.* 2009).

Entre as cepas de EPEC, encontramos o sorotipo O145:H34 (EPECa) e O132:H34 (EPECt), os quais já foram relatados por estarem relacionados com cepas de EPECa e EHEC que causavam infecções entéricas em humanos (Prager *et al.* 2009).

O sorogrupo O109 também está relacionado com EPECa (Peeters *et al.* 1984) e EHEC (Akiyama *et al.* 2017) e foi encontrado em um dos nossos isolados de EPECa. Podemos observar assim que os patótipos de DEC apresentam uma grande heterogeneidade em relação aos sorotipos.

Um importante passo inicial na colonização do trato gastrointestinal humano por bactérias é a adesão do organismo à superfície do hospedeiro. Neste estudo, 92,6% das DEC isoladas foram aderentes e, destas, 74% apresentaram o padrão AA em culturas de células HEp-2, apesar de ser o padrão característico de EAEC, o padrão AA também foi encontrada nas cepas de STEC, ETEC, EIEC e EPEC, que não apresentaram os genes de EAEC pesquisados.

A adesão em cordões foi descrita pela primeira vez por Gioppo *et al.* (2000), em EAECt, e em nosso estudo esse padrão foi observado em uma cepa de EPECa.

Em 2011, uma cepa de EAEC O104:H4 que abrigava o gene *stx* e apresentava o padrão AA causou um grande surto na Alemanha, chamando a atenção para o fenótipo agregativo como um fator importante na patogênese (Bielaszewska *et al.* 2011).

Estudos têm empenhado esforços na identificação de genes que codificam os fenótipos de adesão misto em DEC, como, por exemplo, o estudo de Scaletsky *et al.* (1999) com cepas de EPEC exibindo AL e AD, e o trabalho de Garcia *et al.* (2016) em que EPEC expressava AL e AA. Em nosso estudo também encontramos uma cepa de EPECt exibindo o modelo AL e AA, e estudos posteriores serão feitos para melhor caracterização desta cepa.

Todas as nossas amostras de DEC tiveram a capacidade de formar biofilme, essa característica facilita a sobrevivência de microrganismos em ambientes adversos, como nos sistemas de água potável, em que representam uma fonte potencial de contaminação (Wingender & Flemming, 2011). No hospedeiro, a formação de biofilme protege as bactérias da exposição a defesas imunes inatas, além de facilitar a propagação da resistência aos antibióticos e outros fatores de virulência, contribuindo assim para a persistência de infecção (Kostakioti *et al.* 2013).

Poucos estudos foram realizados para estimar a frequência de bactérias resistentes aos antimicrobianos isoladas de água subterrânea para consumo. Das

DEC isoladas, 7,4% apresentaram resistência a piperacilina-tazobactam e outras 7,4% a cefoxitina.

Na Irlanda, foram encontrados níveis de resistência elevados (93%) aos aminoglicosídeos na água subterrânea de poços privados. Para os antibióticos de uso veterinário, os resultados apontam uma relação significativa entre a quantidade de gado e a prevalência de *E. coli* resistente a múltiplos antibióticos no ambiente (O'Dwyer *et al.* 2017). Na Califórnia, entre os isolados de *E. coli* de amostras de águas subterrâneas em uma fazenda de laticínios, apenas uma amostra apresentou resistência à ceftriaxona, cloranfenicol e tetraciclina (Li *et al.* 2014). Esses dados, tal como o presente estudo, apontam uma frequência variável de resistência à antibióticos em *E. coli* isoladas de água subterrânea.

A presença de bactérias resistentes a antibióticos no meio ambiente representa um sério problema à saúde pública, pois diminui a eficácia de antibióticos utilizados no tratamento de infecções, contribuindo para maior incidência de doença e maior mortalidade (Amaya *et al.* 2011). Embora em nosso estudo tenhamos encontrado elevada sensibilidade aos antimicrobianos, destacamos o potencial risco de contaminação das águas subterrâneas com bactérias resistentes. Consideramos que há uma necessidade de mais pesquisas para se estabelecer a prevalência de resistência aos antibióticos no ambiente hidrogeológico, vez que a água subterrânea é um recurso importante em todo o mundo, especialmente em áreas rurais.

CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos inferir que a água subterrânea *in natura* analisada no presente trabalho é uma potencial fonte de transmissão de DEC. Novos estudos são incentivados e contribuirão para melhorar o entendimento da epidemiologia desses patógenos. Destacamos a necessidade de mudanças na política e no comportamento da população que utiliza essas fontes de água. Além disso, o conhecimento da presença desses patógenos, alerta as agências reguladoras e os funcionários e educadores da saúde, potenciais direcionadores das intervenções apropriadas e da reavaliação das atuais estratégias de prevenção.

REFERÊNCIAS

Abastecimento Urbano De Água 2010 (Urban Water Supply 2010). Report for the Agência Nacional de Águas Brazil (ANA)/Panorama Nacional/Agência Nacional de Águas; Engecorps/Cobrape; Brasilia, Brazil.

Analytical Methods Approved for Compliance Monitoring under the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule 2017. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington, D.C.

Akiyama Y., Futai H., Saito E., Ogita K., Sakae H., Fukunaga M., Tsuji H., Chikahira M., Iguchi A. 2017 Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **70**(2), 181–185. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.100

Amaya E., Reyes D., Vilchez S., Paniagua M., Möllby R., Nord C., Weintraub A. 2011 Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *Journal of Medical Microbiology*. **60**(2), 216–222. doi:10.1099/jmm.0.020842-0

Aranda K. R. S., Fagundes-neto U., Scaletsky I. C. A. 2004 Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(12), 5849–5853. doi: 10.1128/JCM.42.12.5849-5853.2004

Assis F.E., Wolf S., Surek M. De Toni F., Souza E.M., Pedrosa F.O., Farah S.M., Picheth G., Fadel-Picheth C.M. 2014 Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, Southern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **8**(12), 1609–1614. doi: 10.3855/jidc.4434

Beutin L., Zimmermann S., Gleier K. 2002 Evaluation of the VTEC-Screen “Seiken” test for detection of different types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **42**(1), 1–8. doi:10.1016/S0732-8893(01)00325-X

Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A. Peters G., Karch H. 2011 Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infectious Diseases*, **11** (9) 671–676. doi:10.1016/S1473-3099(11)70165-7

Boisen N., Scheutz F., Rasko D. A., Redman J. C., Persson S., Simon J., Kotloff K. L., Levine M. M., Sow S., Tamboura B., Toure A., Malle D., Panchalingam S., Krogfelt K.A., Nataro J.P. 2012 Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *Journal of Infectious Diseases*, **205**(3), 431–444. doi: 10.1093/infdis/jir757

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo

humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 2011.

Chakravarty L., Bhattacharya A., Das S.K. 2017 Water, sanitation and hygiene: The unfinished agenda in the World Health Organization South-East Asia Region. WHO South-East Asia Journal of Public Health, **6**(2), 22-33. doi: 10.4103/2224-3151.213787

Clements A., Young J.C., Constantinou N., Frankel G. 2012 Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes, **3**(2), 71–87. doi: 10.4161/gmic.19182

Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D. M. 2013 The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environmental Microbiology Reports. **5**(1), 58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019

Cravioto A., Gross R.J., Scotland S.M., Rowe B. 1979 An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, **3**(2), 95–99.

de Campos A.C.L.P., Puño-Sarmiento J.J., Medeiros L.P., Gazal L.E.S., Maluta R.P., Navarro A., Kobayashi R.K.T., Fagan E.P., Nakazato G. 2017 Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. Foodborne Pathogens and Disease, **5**(2), 94–100. doi: 10.1089/fpd.2017.2345

Dudley E.G., Thomson N.R., Parkhill J., Morin N.P., Nataro J.P. 2006 Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, **61**(5), 1267–1282. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x

Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B., Denamur E. 2001 Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology (england), **147**(6), 1671–1676. doi: 10.1099/00221287-147-6-1671

Gambero M. L., Blarasin M., Bettera S., Albo J. G. 2017 Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in a rural environment. Journal of Water and Health, **15**(5), 757–765. doi: 10.2166/wh.2017.281.

Garcia B. G., Ooka T., Gotoh Y., Vieira M. A., Yamamoto D., Ogura Y., Girão D. M., Sampaio S. C., Melo A. B., Irino K., Hayashi T., Gomes T. A. 2016 Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. International Journal of Medical Microbiology. **306**(3), 152–164. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.02.008

Gioppo N.M., Elias W.P. Jr., Vidotto M.C., Linhares R.E., Saridakis H.O., Gomes T.A., Trabulsi L.R., Pelayo J.S. 2000 Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia*

coli and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with or without diarrhoea, in Londrina, Brazil. FEMS Microbiology Letters, **190**(2) 293–298.

Guidelines for drinking-water quality 2011. 4th edn. World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland.

Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G., Riley L.W. 1995 Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundleforming pilus gene. Journal Clinical of Microbiology, **33** (5), 1375–1377.

Huang S-W., Hsu B-M., Su Y-J., Ji D-D., Lin W-C., Chen J-L., Shih F-C., Kao P-M., Chiu Y-C. (2012) Occurrence of diarrheagenic *Escherichia coli* genes in raw water of water treatment plants. Environmental Science and Pollution Research, **19**(7),2776–2783. doi: 10.1007/s11356-012-0777-4

Ishii S., Meyer K. P., Sadowsky M. J. 2007 Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources. Applied and Environmental Microbiology. **73**(18), 5703-5710. doi:10.1128/AEM.00275-07.

Kambire O., Adingra A. A., Yao K. M., Koffi-Nevry R. 2017 Prevalence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes of *Escherichia coli* Isolates from Water, Sediment, Fish, and Crab in Aby Lagoon, Côte d'Ivoire. International Journal of Microbiology, **2017**, 1253–1260. doi: 10.1155/2017/9532170

Karmali M. A., Gannon V. & Sargeant J. M. 2010 Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Veterinary Microbiology, **140** (3-4), 360–370. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.011

Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J. 2013 Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. **3** (4), a010306. doi: 10.1101/cshperspect.a010306

Lascowski K. M. S., Guth B. E. C., Martins F. H., Rocha S. P. D., Irino K., Pelayo J. S. 2013 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. Journal of Applied Microbiology, **114**(4) 1230–1239. doi:10.1111/jam.12113

Li X., Watanabe N., Xiao C., Harter T., McCowan B., Liu Y., Atwill E. R. 2014 Antibiotic-resistant *E. coli* in surface water and groundwater in dairy operations in Northern California. Environmental Monitoring and Assessment, **186**(2), 1253–1260. doi: 10.1007/s10661-013-3454-2

Liu B., Knirel Y.A., Feng L., Perepelov A.V., Senchenkova S.N., Wang Q., Reeves P.R., Wang L. 2008 Structure and genetics of *Shigella* O antigens. FEMS Microbiology Reviews, **32** (4), 627–653. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00114.x

- Mellmann A., Fruth A., Friedrich A.W., Wieler L.H., Harmsen D., Werber D., Middendorf B., Bielaszewska M., Karch H. 2009 Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerging Infectious Disease journal*, **15**(9):1474–7. doi: 10.3201/eid1509.090161.
- Mereghetti L., Tayoro J., Watt S., Lanotte P., Loulergue J., Perrotin D., Quentin R. 2002 Genetic relationship between *Escherichia coli* strains isolated from the intestinal flora and those responsible for infectious diseases among patients hospitalized in intensive care units. *Journal of Hospital Infection*, **52**(1), 43–51. doi: 10.1053/jhin.2002.1259
- Miliwebsky E., Schelotto F., Varela G., Luz D., Chinen I., Piazza R. M. F. 2016 Human diarrheal infections: diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. In: Torres A.G., ed. *Escherichia Coli in the Americas*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2016, 343–369.
- Mohawk K. L. & O'Brien A. D. 2011 Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**(5), 2581–85. doi: 10.1155/2011/258185.
- Murakami J., Kishi K., Hirai K., Hiramatsu K., Yamasaki T., Nasu M., 2000 Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **15**(2), 103–109.
- Navab-Daneshmand T., Friedrich M. N. D., Gächter M., Montealegre M. C., Mlambo L. S., Nhwatiwa T., Mosler H. J., Julian T. R. 2018 *Escherichia coli* Contamination across Multiple Environmental Compartments (Soil, Hands, Drinking Water, and Handwashing Water) in Urban Harare: Correlations and Risk Factors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**(3), 803–813 doi: 10.4269/ajtmh.17-0521.
- Navarro A., Eslava C., Perea L.M., Inzunza A., Delgado G., Morales-Espinosa R., Cravioto A. 2010 New enterovirulent *Escherichia coli* serogroup 64474 showing antigenic and genotypic relationships to *Shigella boydii* 16. *Journal of Medical Microbiology*, **59** (4), 453–461. doi: 10.1099/jmm.0.015602-0
- Navarro A., Eslava-Campos C. A., Melendez-Herrada E., Cravioto E. 2016 *Escherichia coli* derived from different sources share antigenic characteristics with *Shigella boydii* 18 and virulence factors with enterotoxigenic *E. coli*. *International Journal of Advanced Research*, **4** (10), 629–638. doi:10.21474/IJAR01/1840
- O'Dwyer J., Hynds P. D., Pot M., Adley C. C., Ryan M. M. 2017 Evaluation of levels of antibiotic resistance in groundwater-derived *E. coli* isolates in the Midwest of Ireland and elucidation of potential predictors of resistance. *Hydrogeology Journal*, **25**(9), 939–951. Doi: 10.1007/s10040-017-1546-8.
- Park J., Kim J. S., Kim S., Shin E., Oh K.H, Kim Y., Kim C.H., Hwang M. A., Jin C. M., Na K., Lee J., Cho E., Kang B. H., Kwak H. S., Seong W. K., Kim J. A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with

drinking water at a school camp. *International Journal of Infectious Diseases*, **66**, 45–50. doi: 10.1016/j.ijid.2017.09.021

Park J., Kim J.S., Kim S., Shin E., Oh K.H., Kim Y., Kim C.H., Hwang M.A., Jin C.M., Na K., Lee J., Cho E., Kang B.H., Kwak H.S., Seong W.K., Kim J. 2018 A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp. *International Journal of Infectious Diseases*, **66**, 45–50. doi: 10.1016/j.ijid.2017.09.021

Paton A. W. & 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*. *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (2), 598–602.

Peeters J.E., Charlier G.J. & Halen P.H. 1984 Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. *Infection and Immunity*, **46**(3), 690–696.

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2016 26th edn, CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Prager R., Fruth A., Siewert U., Strutz U., Tschäpe H. 2009 *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*, **299**(5), 343–353. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008.

Prüss-Üstün A., Bos R., Gore F., Bartram J. 2008 Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. World Health Organization, Geneva.

Scaletsky I. C., Pedroso M. Z, Oliva C. A., Carvalho R. L, Morais M. B., Fagundes-Neto U. 1999 A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infection and Immunity*, **67**(7), 3410–3415

Schmidt H., Knop C., Franke S., Aleksic S., Heesemann J., Karch H. 1995 Development of PCR for screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33** (3), 701–705.

Schultsz C., Pool G. J., van Ketel R., de Wever B., Speelman P., Dankert J. 1994 Detection of ETEC in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**(10), 2393–2397.

Schuroff P. A., Burgos T. N., Lima N. R., Lopes A. M., Pelayo J. S. 2014 Phenotypic and genotypic characterization of potentially pathogenic *Escherichia coli* from water treatment plants. *Arquivos de Ciências da Saúde*, **21**(3) 93–98.

Spano L. C., Cunha K. L., Monfardini M. V., Fonseca R. C. Scaletsky I. C. F. 2017 High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. *BMC Infectious Diseases*, **17**, 773. doi: 10.1186/s12879-017-2872-0

Wakimoto N., Nishi J., Sheikh J., Nataro J.P., Sarantuya J., Iwashita M., Manago K., Tokuda K. Yoshinaga M., Kawano Y. 2004 Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71** (5), 687–690.

Walk S. T., Alm E.W., Calhoun L. M., Mladonicky J. M., Whittam T. S. 2007 Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology*, **9**(9), 2274–2288. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01341.x.

Wingender J. & Flemming H. C. 2011 Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **214**(6), 417-423. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.05.009

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos pesquisados e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados no diagnóstico molecular das DEC.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3')	Tamanho dos fragmentos (pb)	Referência
<i>bfpA</i>	(F) CAATGGTGCTTGCGCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT	326	Gunzburg; Tornieporth; Riley (1995)
<i>eae</i>	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	Paton; Paton (1998)
<i>stx1</i>	(F)ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R)AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Paton; Paton (1998)
<i>stx2</i>	(F) GGC ACTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	Paton; Paton (1998)
<i>ST Ia</i>	(F)TCTGTATTATCTTTCCCCTC (R)ATAACATCCAGCACAGGC	186	Schultsz <i>et al.</i> (1994)
<i>ST Ib</i>	(F)CCCTCAGGATGCTAAACCAG (R) TTAATAGCACCCGGTACAAGC	166	Schultsz <i>et al.</i> (1994)
<i>elt</i>	(F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATTCCCTGTT	450	Aranda <i>et al.</i> (2004)
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
<i>aggR</i>	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT	308	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	Dudley <i>et al.</i> (2006)
<i>aaiC</i>	(F) ATTGTCCTCAGGCATTTACACG (R) ACACCCCTGATAAACAA	215	Lima <i>et al.</i> (2013)
<i>ipaH</i>	(F) GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	Aranda; Fagundes- Neto; Scaletsky (2004)

Tabela 2 – Características genotípicas e fenotípicas de DEC isoladas de amostras de água de minas e poços rasos da região norte do Paraná, Brasil.

Nº do isolado	Perfil genotípico	Sorotipo	Perfil fenotípico				Grupo filogenético	Patotipo
			Stx ^a	HEp-2 ^b	Formação de Biofilme	Perfil de Resistência		
185	<i>eae</i>	O44037:H7	NR	CLA	+	PPT	B1	EPECa
245	<i>eae</i>	O145:H34	NR	ALL	+	Suscetível	B2	EPECa
349	<i>eae</i>	O109:H21	NR	ALL	+	Suscetível	B2	EPECa
326	<i>eae, bfp</i>	O132:H34	NR	AL/AA	+	Suscetível	B1	EPECt
20	<i>stx2</i>	O103:H7	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
8	<i>stx2</i>	O185:H16	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
27	<i>stx2</i>	O4:H12	+	AA	+	PPT	C	STEC
216	<i>stx2</i>	O73:H12	+	AA	+	Suscetível	C	STEC
222	<i>stx2</i>	O103:H16	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
15	<i>stx2</i>	O139:H7	+	NA	+	Suscetível	B1	STEC
22	<i>stx2</i>	O91:H10	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
54	<i>stx2</i>	O150:H8	+	AD	+	Suscetível	B1	STEC
58	<i>stx2</i>	O49:H49	+	NA	+	Suscetível	E	STEC
62	<i>stx2</i>	O6:H49	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
141	<i>stx2</i>	O91:H21	+	AA	+	Suscetível	B1	STEC
146	<i>stx2</i>	O64474:H12	+	NC	+	suscetível	E	STEC
240	<i>stx1</i>	O107:HNT	+	AA	+	^c CFO	B2	STEC
99	<i>aggR</i>	O64474:H2	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECt
138	<i>aggR</i>	O64474:H2	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECt
269	<i>aggR</i>	O8:H48	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECt
134	<i>aaiA</i>	O69:H-	NR	AA	+	Suscetível	C	EAECa
310	<i>aaiA</i>	O48:H21	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECa
355	<i>aaiA</i>	O88:HNT	NR	AA	+	CFO	C	EAECa
358	<i>aaiA</i>	O91:H21	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECa
362	<i>aaiA</i>	O140:H21	NR	AA	+	Suscetível	B1	EAECa
5	<i>stl-a</i>	O150:H20	NR	AA	+	Suscetível	C	ETEC
181	<i>ipaH</i>	O93:H20	NR	AA	+	Suscetível	B1	EIEC

NR: não realizado, CLA: *chain-like adherence*, ALL: Adesão localizada-*like*, AL: Adesão localizada, AA: Adesão agregativa, NA: Não aderente, NC: Não caracterizada, AD: Adesão difusa, PPT: Piperacilina-tazobactam, CFO: Cefoxitina, H-: não móvel, HNT: antígeno H não tipável.

^aEfeito citotóxico em células Vero

^bEnsaio de adesão em células HEp-2

^cResistência intermediária.

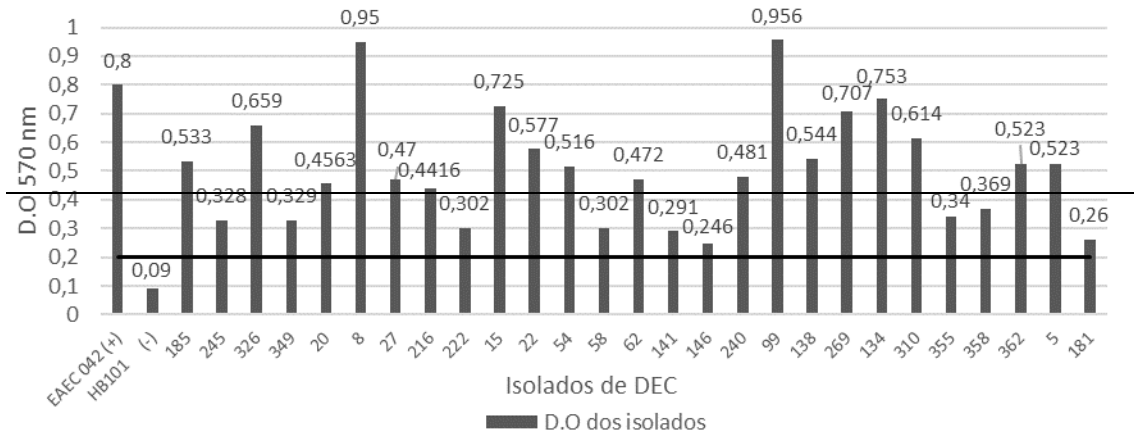


Gráfico 1 – Formação de biofilme pelos isolados de DEC.

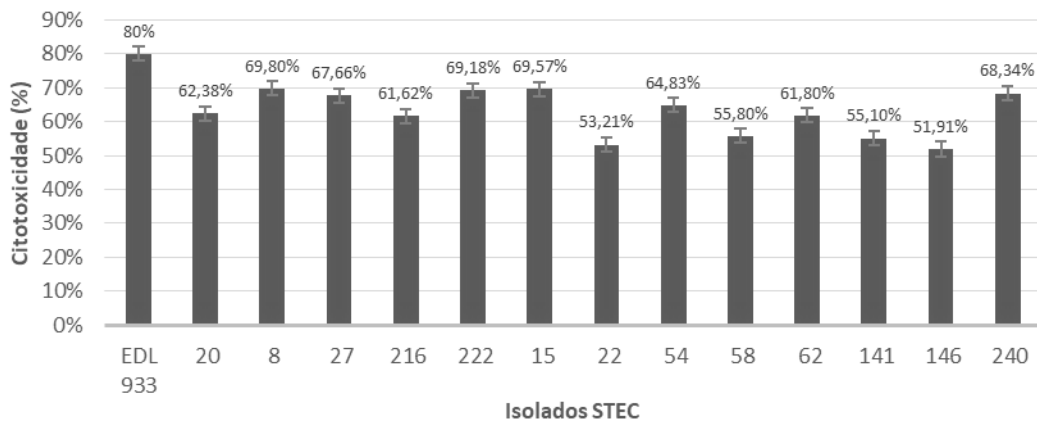


Gráfico 2 – Citotoxicidade em células Vero dos isolados de STEC.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos inferir que a água subterrânea *in natura* analisada no presente trabalho é uma potencial fonte de transmissão de DEC. Novos estudos são incentivados e contribuirão para melhorar o entendimento da epidemiologia desses patógenos. Destacamos a necessidade de mudanças na política e no comportamento da população que utiliza essas fontes de água. Além disso, o conhecimento da presença desses patógenos, alerta as agências reguladoras e os funcionários e educadores da saúde, potenciais direcionadores das intervenções apropriadas e da reavaliação das atuais estratégias de prevenção.