CARLOS ALFREDO SALCI QUEIROZ

Diversidade entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de água utilizada para consumo humano

Londrina
2008

CARLOS ALFREDO SALCI QUEIROZ

Diversidade entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de água utilizada para consumo humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia,

Orientadora: Profª Drª Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2008

CARLOS ALFREDO SALCI QUEIROZ

Diversidade entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de água utilizada para consumo humano

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
Universidade de Campinas

_____

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Programa Pós Graduação em Microbiologia
Universidade Estadual de Londrina
Embrapa-Soja

_____

Prof ª Dr ª Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina, 29 de fevereiro de 2008

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Cícero e Lucinéia que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Jacinta Sanchez Pelayo pela orientação por todos esses anos. Muito obrigado mesmo!

Ao Dr. Fernando Gomes Barcellos, pelo apoio científico e orientação essencial para a conclusão desta dissertação.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia da UEL. Alssandra, Sílvia, Karen, Rafael, Bárbara, André, Milton, Ariane, Cláudia, Kathelin, Paula, Sérgio e Raquel.

À todos os colegas do laboratório de Biotecnologia na Embrapa.

À Profa Dra Halha Ostresky Saridakis, que sempre deu uma força no laboratório quando precisei.

Aos funcionários de departamento; Claci, Pedro e Zui.

À todos meus colegas de turma, pela convivência e paciência comigo.

Aos meus amigos da república; Wesley, Guilherme, Rafael, Giovani e Flávio.

A todos que me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao órgão de fomento Capes que financiou meus estudos, sem ele não seria possível.

Muitíssimo obrigado!

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1 *Escherichia coli* 4
2.2 Reservatórios e fontes de contaminação 7
2.3 *Escherichia coli* e a qualidade da água 8
2.4 Surtos de *Escherichia coli* devido à qualidade da água 10
2.5 Identificação e caracterização de *Escherichia coli* 11
2.5.1 Método colorimétrico, Colillert Quanti-Tray (IDEXX) 11
2.5.2 Métodos com base em PCR 12
2.6 Grupos Filogenéticos 14
3 OBJETIVOS 16
3.1 Objetivo Geral 16
3.2 Objetivos Específicos 16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 17
3 ARTIGO: Diversity among strains of the *Escherichia coli* isalated from drinking water in the northen of Parana, Brazil, determined by BOX-PCR 23
ABSTRACT 23
INTRODUCTION 24
MATERIAL AND METHODS 26
Sampling 26
Microbiological analysis of water samples 26
Isolation and Identification of *Escherichia coli* 27
Extraction of DNA 27
PCR amplification with specific BOX A1R primer 27
PCR–RFLP of 16 S ribosomal gene 28
The Phylogenetic groups 28
RESULTS and DISCUSSION 29
Diversity of the isolates considering the profile base BOX-PCR 29
PCR–RFLP of 16 S ribosomal gene 31
Phylogenetic groups 32
Correlation between BOX-PCR and phylogenetic groups 33
REFERENCES 34

Resumo

Este estudo foi realizado com 139 cepas de *Escherichia coli* isoladas de água tratada e *in natura* usada para consumo humano, no período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006, coletadas da rede municipal de abastecimento dos municípios pertencentes a 17ª e 18ª regionais de Saúde no Estado do Paraná, Brasil. Devido ao fato da presença de contaminantes fecais na água apresentar um risco à saúde humana, foi estudado a diversidade genética desses isolados, considerando a possibilidade de isolados patogênicos contaminarem as fontes de água dessas regiões. Por meio da técnica de BOX-PCR e RFLP do gene ribosomal 16S, foi estudada a diversidade genética existente entre todos os isolados, os quais foram classificados em grupos filogenéticos designados: A, B_1, B_2 e D. Foi encontrado uma alta taxa de diversidade entre os isolados com a confirmação da presença de clones circulantes em municípios diferentes, ou seja, clones que podem provir de uma mesma fonte de contaminação. Desta forma concluiu-se que, as águas de superfície e/ou subterrâneas que abastecem os municípios podem ser os disseminadores de patógenos entre essas regiões. A classificação em grupos filogenéticos juntamente com a análise de diversidade genética com base na técnica de BOX-PCR, permitiu estimar o grau de patogenicidade das cepas em estudo, visto que a porcentagem de cepas pertencentes ao grupo B_2 (grupo com maior freqüência de cepas patogênicas) foi muito baixa (4.7% total da amostragem). Foi possível, assim, demonstrar a importância da água na disseminação de microorganismos patogênicos e a relevância das técnicas empregadas em estudos de levantamentos epidemiológicos em micro-regiões.

Abstract

In this study, 139 strains of *Escherichia coli* were isolated from drinking water between February 2005 and February 2006. They were collected from different cities in the northern region of Parana State, Brazil. Due to the fact that fecal contaminants in water are considered a threat to human health and that the presence of pathogenic strains may contaminate water sources in this region, the genetic diversity of these isolated strains was studied. BOX-PCR and PCR-RFLP of the 16S ribosomal gene were used to study the genetic diversity among all the isolates, which were also classified into phylogenetic groups: A, B_1, B_2 and D. A high level of diversity among the isolates and clones in different counties or among clones from the same source of contamination was observed. Therefore, the rivers or aquifers that supply the cities may be pathogen carriers in this region. The classification of these strains into phylogenetic groups together with the analysis of genetic diversity based on BOX-PCR gave us an idea of the extent of pathogenic strains, since the percentage of strains belonging to the B_2 group was very low, 4.7% of the overall sample. This analysis thus demonstrates the importance of water in the spread of pathogenic microorganisms and the importance of the techniques used in studies of epidemiological surveys in micro-regions.

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli são microrganismos anaeróbios facultativos pertencentes à microbiota intestinal de humanos e animais. Este microrganismo coloniza o trato gastrointestinal dentro das primeiras horas de vida, e, depois disso, *E. coli* e o hospedeiro interagem mutualisticamente. Entretanto, quando o hospedeiro está debilitado e/ou imunodeprimido as cepas de *E. coli* podem causar infecções limitadas às superfícies de mucosas ou podem disseminar por todo o corpo. Dentre as principais infecções causadas por *E. coli* estão: as infecções extra-intestinais (infecção do trato urinário, infecção do sistema nervoso central e sepse) e as infecções entéricas.

Todos os animais de sangue quente são considerados reservatórios de *E. coli*, e estes microrganismos por sua vez são disseminados pelo ambiente contaminando as fontes de água potável e os alimentos. Sendo *E. coli* o mais preciso indicador de contaminação fecal, a presença de coliformes fecais nas fontes de água e alimentos, representam um risco a saúde da população que os consomem.

Devido ao risco à saúde que a contaminação da água nos alerta é essencial para nossas vidas sua preservação. Seus múltiplos usos são indispensáveis às atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática.

A ação antrópica nas últimas décadas tem sido muito desfavorável ao meio ambiente, a crescente expansão demográfica e industrial trouxe como conseqüência o comprometimento das águas de rios, lagos e reservatórios. Assim aumentaram as doenças causadas por falta de saneamento básico, principalmente as relacionadas com a

qualidade da água. Os descartes industriais, esgotos domésticos, dejetos urbanos são alguns exemplos das diversas ações do homem na contaminação do ambiente.

Visando a uma redução do risco a saúde humana por patógenos, a avaliação da qualidade da água de abastecimento possibilita a identificação de fontes de contaminação e levantamentos epidemiológicos permitindo assim um melhor planejamento das políticas de prevenção e controle de epidemias.

As espécies bacterianas podem possuir distintos genótipos e fenótipos, refletindo em uma ampla diversidade funcional e estrutural. Esta escala de diversidade, denominada microdiversidade bacteriana, pode ser verificada através de técnicas moleculares de alta resolução. Os estudos moleculares de microdiversidade disponibilizam informações refinadas, que permitem o entendimento de grupos funcionais de microrganismos e, especialmente, suas relações com ambientes e condições particulares.

A metodologia de Rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) tem sido muito utilizada em estudos de epidemiologia entre espécies *de Enterobacteriaceae*, em que são analisadas sequências repetitivas e conservadas presentes no DNA cromossomal desses microrganismos. A similaridade quanto à presença dessas seqüências indica o grau de diversidade existente entre as cepas de estudo, assim podemos identificar clones e rastrear fontes de contaminação.

Outras técnicas, como a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos distintos (A, B_1, B_2 e D), também é utilizada com o intuito de separar as cepas de E. coli de acordo com sua potencialidade de virulência. Através do estudo de dois genes (*chuA*, *yjaA*) e um fragmento de DNA (*TSPE4.C2*).

Neste presente estudo teve-se por objetivo analisar a diversidade de cepas de *E. coli* isoladas de águas de diferentes fontes de coleta da Região de Londrina-PR através do marcador molecular BOX–PCR (*BOX elements*) e pela análise dos grupos filogenéticos. Os perfis obtidos foram comparados quanto ao nível de similaridade, foram utilizadas 6 cepas padrões de *E. coli* diarreiogênicas (*E. coli* enteropatogênica, *E.coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* que adere difusamente, *E. coli* enterohemorrágica) como controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

E. coli faz parte da família *Enterobacteriacea*, que consiste de um grande grupo que engloba bactérias Gram-negativas associadas a infecções intestinais, mas podem ser encontradas em quase todos os ambientes naturais. Tal família engloba espécies intimamente relacionadas (HOFFMANN & ROGGENKAMP, 2003), pertencentes a vários gêneros: *Arizona, Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Pantoea, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Yersinia, Escherichia*, no qual *E. coli* é a espécie mais estudada (BERGEY, *et al*., 1994).

Infecções devido a cepas de *E. coli* patogênicas podem ser limitadas às superfícies de mucosas ou podem disseminar por todo o corpo. Dentre as principais infecções causadas por *E. coli* estão: as infecções extra-intestinais (infecção do trato urinário, infecção do sistema nervoso central e sepse) e as infecções entéricas (NATARO & KAPER, 1998).

Cepas de *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e estão agrupadas em seis categorias, considerando os mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O: H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO & KAPER, 1998). Esses grupos de *E. coli* diarreiogênicas são classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria

dos pesquisadores, torna-se evidente que algumas categorias incluem microrganismos bastante diferentes. Desta forma, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER *et al*., 2004).

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

Cepas de STEC podem produzir um ou ambos os tipos de toxina Shiga, designadas Stx1 e Stx2, a última intimamente relacionada à SHU. Algumas cepas de STEC, caracterizadas como EHEC, também têm a capacidade de produzir a lesão histopatológica conhecida como *attaching and effacement* (A/E) na mucosa intestinal, uma propriedade codificada por genes presentes na ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à membrana apical da célula epitelial e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais (MOON *et al.*, 1983).

Dentro do grupo de *E. coli,* que causam a lesão A/E e portadoras da região LEE, também encontram-se as EPEC típicas e atípicas. O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para caracterizar amostras de *E. coli* que diferiam das EPEC típicas por não apresentarem o plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*) e das EHEC, por não produzirem a toxina Shiga (KAPER, 1996). O plasmídio EAF contém os genes envolvidos com a síntese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além da seqüência genética referente ao fragmento da sonda EAF e do operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica genes reguladores de fatores de

virulência de EPEC. Tanto EPEC típica como a atípica são capazes de formar a lesão A/E (TRABULSI *et al*., 2002).

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

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

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

Outra categoria de *E. coli* diarreiogênica é conhecida com DAEC e pode ser identificada inicialmente pelo modelo de adesão em células. DAEC é definida como a categoria de *E. coli* diarreiogênica que adere a células epiteliais, cultivadas *in vitro*, de forma difusa (AD) sobre toda a superfície celular (SCALETSKY *et al*., 1984). A adesão destas bactérias pode ser mediada por dois tipos de adesinas, sendo uma fimbrial (F1845) e outra afimbrial (AIDA-I) (BILGE *et al.*, 1989; BENZ & SCHIMIDT, 1992). Entretanto, o mecanismo de patogenicidade desses microrganismos permanece pouco elucidado (NATARO & KAPER, 1998).

2.2 Reservatórios e fontes de contaminação

Além dos seres humanos, também são considerados reservatórios de *E. coli,* bovinos, eqüinos, cães, pássaros e aves em geral, assim como a água (HANCOCK *et al*., 1998). Acredita-se que a ampla disseminação de *E. coli* pelos animais no meio ambiente resulta na contaminação de água e alimentos e consequentemente em infecções desse patógeno no homem (RASMUSSEN *et al*., 2001).

A superfície aquática frequentemente é contaminada por bactérias de origem fecal (BARNES *et al*., 2004). A presença de contaminantes fecais na água é considerada um risco a saúde humana. Diversas são as fontes de contaminação, tais como: esgotos domésticos, dejetos urbanos, descartes industriais, entre outros. Muitos patógenos entéricos tem sido isolados destes ambientes, como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, o vírus da hepapite A, todos resultantes da contaminação fecal (DONBEK *et al*., 2000).

Fezes de animais domésticos contribuem significativamente para contaminação por *E. coli*, inclusive a do sorotipo O157:H7 e *Cryptosporidium* spp. (FUJIOkA, 2002).

2.3 *Escherichia coli* e a qualidade da água

E. coli também é utilizada como parâmetro de controle da qualidade da água para consumo, tendo em vista todas as implicações que a presença desse microrganismo pode causar à saúde humana (FARNLEITNER *et al*., 2000), entretanto a quantidade de coliformes permitidos varia conforme a finalidade da água, ou seja, para consumo humano, banho, agricultura e processos industriais (KREADER, 1995).

O Decreto nº. 5.440, de 4 de maio de 2005 (BRASIL b), traz que *E. coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal, e de eventual presença de organismos patogênicos; e que, a água para consumo humano, deve obrigatoriamente, não possuir coliformes fecais. Cabe a cada município o tratamento da água, o controle microbiológico e físico-químico para o consumo de sua população.

Segundo Fewtrell & Bartram (2001), a qualidade da água para consumo humano está diretamente relacionado à saúde pública. Mesmo nas áreas geográficas onde os investimentos significativos são feitos para proteger a qualidade da água, a contaminação fecal representa uma ameaça. Isto é particularmente verdadeiro quando os recursos de água potável estão dentro ou próximo de regiões agrícolas ou áreas urbanas; aumentando o risco da contaminação por dejetos agrícolas, esgotos, falhas de sistemas sépticos rurais e na drenagem da água de chuva (EDBERG *et al*., 2000).

As doenças relacionadas com a água continuam sendo um dos principais problemas de saúde a nível mundial. Estima-se que 4 bilhões de casos de diarréia representou 5,7% do total de doenças registradas em 2000 (WHO, 2002). Uma das principais estratégias para solucionar esse problema é a instalação de reservatórios (caixa d'água, poços artesianos e reservatórios comuns) de melhor qualidade. No entanto, reservatórios de distribuição estão a certa distância das casas, exigindo coleta e

transporte da água desde a fonte até o armazenamento nas casas. Frequentemente é observado que a qualidade microbiológica da água é menor dentro das casas do que na fonte, sugerindo que a contaminação muitas vezes é gerada durante a coleta, transporte ou armazenagem da mesma (VAN ZIJL *et al*., 1966; LINDSKOG & LINDSKOG, 1988). Esta contaminação pode ser diminuída com melhorias nas fontes e nos reservatórios com benefícios para a saúde.

O fornecimento de água potável de alta qualidade é o elemento fundamental para o bem da saúde pública. Uma série de investigações sobre surtos de doenças aquáticas levantou a preocupação com a segurança do abastecimento de água potável nos países desenvolvidos (PAYMENT *et al*., 1991; FURTADO *et al*., 1998). A maior preocupação é que os ensaios realizados sugeriram que nas normas convencionais, a água potável pode causar entre 14 e 34% de gastroenterite na comunidade (PAYMENT *et al*., 1991). Nos Estados Unidos isto implicaria que 39 a 96 milhões de casos de gastrenterites anualmente são atribuíveis à água potável com base em uma estimativa da incidência de gastroenterites (MEAD *et al*., 1999).

A presença de *E. coli* tanto em água como em alimentos constitui uma preocupação significante para a saúde pública. A transmissão de fatores de virulência entre cepas de *E. coli* contribui para sua patogenicidade, e aumenta sua diversidade no ambiente (DONNENBERG *et al*., 2001). Cepas de *E.coli* patogênicas podem derivar de cepas comensais por aquisição de genes de virulências cromossomais ou extra-cromossomais (FINLAY & FALKOW, 1997; OCHMAN *et al*., 2000). Para Sokurenko *et al*. (1998), deleções genômicas que realçam a patogenicidade ou mutações funcionais aleatórias, que são adaptações do patógeno ao ambiente, também podem representar estratégias da plasticidade genômica de cepas comensais, podendo assim, se tornarem virulentas (SELANDER & LEVIN, 1980).

2.4 Surtos de *Escherichia coli* devido à qualidade da água

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

Em Missouri, Swerdlow *et al*. (1992) descreveram um surto de diarréia causada por *E. coli* O:157 H7 isoladas da água de abastecimento em pequenas cidades da região. Também foi relatado um outro surto causado por *E. coli* O:157 H7 por Geldreich *et al*. (1992), no qual foram registradas 4 mortes, 32 hospitalizações e um total de 243 casos documentados de diarréia ligados ao sistema pública de abastecimento de água. Higgins *et al*. (2005) detectaram a presença de cepas de STEC isoladas de água da região metropolitana de Baltimore (EUA). Já no Brasil, Apoitia *et al*. (2004) constataram que 15% das águas subterrâneas de Cuiabá (BR) estão contaminadas com *E. coli*. Conte *et al*. (2003) avaliaram microbiologicamente as águas tratadas e não tratadas da região nordeste do estado de Rio de Janeiro (BR), e verificaram que 25% estão contaminadas com *E. coli*.

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

2.5 Identificação e caracterização de *Escherichia coli*

Existem vários métodos qualitativos e quantitativos para detectar a presença de coliformes fecais na água, tais como os métodos colorimétricos e métodos genotípicos com base em PCR (FARNLEITNER *et. al*., 2000).

Os métodos para determinar fontes da poluição fecal incluem a caracterização fenotípica e genotípica das bactérias indicadoras de contaminação fecal (SEURINCK *et al*., 2003). Vários pesquisadores empregaram marcadores moleculares (rep-PCR) para inferir correlações de diversidade entre as amostras de *E. coli* e seus respectivos hospedeiros. Estes estudos demonstraram a ocorrência de uma ampla diversidade entre isolados de um mesmo hospedeiro (PARVEEN *et al*., 1999; CARSON *et al*., 2001).

Esta escala de diversidade, denominada microdiversidade bacteriana, pode ser acessada através de técnicas moleculares de alta resolução. Os estudos moleculares de microdiversidade disponibilizam informações refinadas, que permitem o entendimento de grupos funcionais de microrganismos e, especialmente, suas relações com ambientes e condições particulares (SCHLOTER *et al*., 2000).

2.5.1 Método colorimétrico, Colilert Quanti-Tray (IDEXX)

O Colilert utiliza tecnologia de substrato definido (triptose, ONPG e MUG) para detecção de coliformes totais e *E. coli* em água. Os coliformes totais utilizam a enzima β-galactosidase para metabolizar o indicador de nutriente o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) adquirindo coloração amarela (Figura I). *E. coli* utiliza a enzima β-glucuronidase para metabolizar o indicador 4-metil-umbeliferil (MUG) e liberar um subproduto fluorescente (Figura II).

Figura I: Esquema do Metabolismo do ONPG.

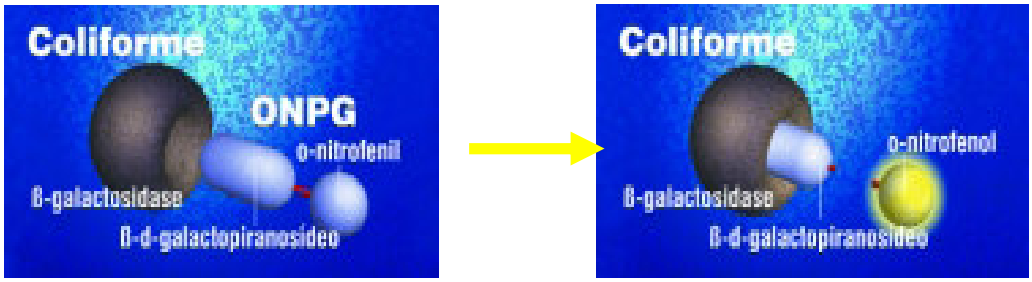
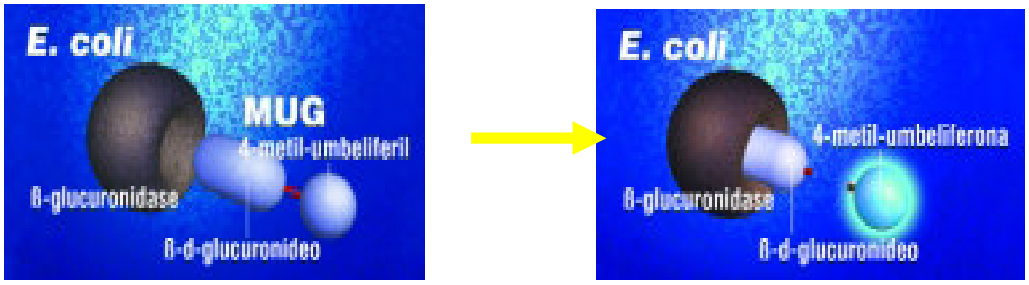


Figura II: Esquema do Metabolismo do MUG.



2.5.2 **Métodos com base em PCR**

Vários estudos têm usado variações da técnica de PCR, baseada na utilização de iniciadores correspondentes a seqüências repetitivas intergênicas, de consenso, dispersas pelo genoma bacteriano (rep – PCR) (Figura III). Essas seqüências são conhecidas como ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) e BOX (*Box elements*), as quais geram padrões altamente característicos após eletroforese em gel de agarose, o que permite a caracterização da diversidade do genoma bacteriano (KOEUTH *et al.*, 1995 JOHNSON *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2002).

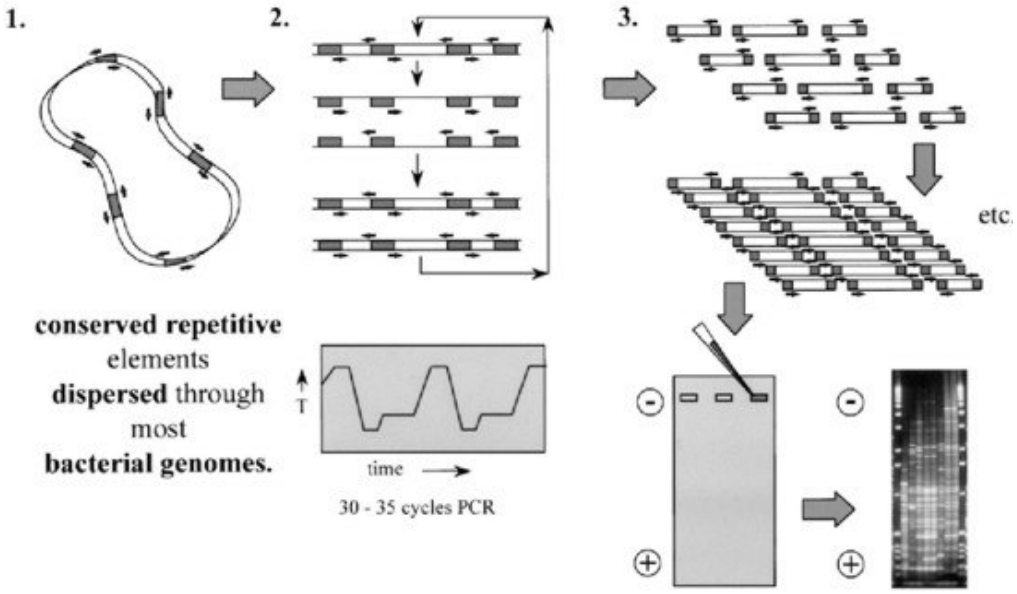


Figura III: Esquema ilustrativo da obttenção do perfil genômico através da técnica de rep-PCR. 1. Prováveis sítios de anelamento pelos oligonucleotídeos universais (*primers*), 2. Amplificação das seqüências repetitivas e 3. Fragmentos obtidos e visualizados por eletroforese em agarose (LAUWS *et al*. 1999).

A metodologia de BOX-PCR tem sido muito utilizada em estudos de epidemiologia de espécies *de Enterobacteriaceae*, como *E. coli* (SIGLER & PASUTTI, 2006). Dombeck *et al*. (2000) utilizou a técnica de BOX-PCR avaliando isolados de *E. coli* provenientes de fontes de contaminação distintas. Observou-se que os isolados pertencentes a diferentes fontes (humanos, cachorros, patos, etc.) possuíam similaridade quanto ao perfil genômico, enquanto que os isolados de uma mesma fonte apresentaram maior similaridade devido à presença de faixas de bandas características.

Junto à análise das seqüências repetitivas intergênicas, a análise de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do rDNA 16S, pode vir a confirmar a similaridade dos isolados analisados pelo rep-PCR em nível de gênero ou espécie. Este método consiste na amplificação e posterior digestão do rDNA com enzimas de restrição, e é baseado no princípio de que os sítios de restrição do rDNA são conservados de acordo com padrões filogenéticos (LAUWS *et al*. 1999). O genoma de certos organismos filogeneticamente idênticos apresenta profundas divergências. *E. coli* K-12 e O157: H7 não diferem apenas no tamanho do genoma (por 0,89 Mb), mas

também quanto a um número considerável de genes cromossômicos. Vinte e cinco por cento dos genes presentes em cepas entero-hemorrágicas de *E. coli* O157: H7 não são encontradas em cepas não patogênicas de *E. coli* K-12, enquanto que 12% dos genes no último organismo estão ausentes em relação ao primeiro. No entanto, algumas seqüências genéticas como o gene ribossomal 16S rDNA são idênticas nos dois organismos (PERNA *et al*., 2001).

2.6 Grupos Filogenéticos

Além dos marcadores moleculares para o estudo da diversidade microbiana, a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* descrita por Herzer *et al*. (1990) utilizando *Multilocus enzyme electrophoresis* com 72 cepas de uma coleção de *E. coli* de referência (ECOR) (OCHMAN & SELANDER, 1984), a qual foi subsequentemente confirmada por Dejardins *et al*. (1995) por comparação com o uso de vários marcadores moleculares, é utilizada na análise das origens de diversas populações naturais de cepas de *E. coli* patogênicas e de *Shigella* (PUPO *et al*., 1997).

A análise filogenética tem demonstrado que as cepas de *E. coli* dividem-se em quatro grandes grupos (A, B_1, B_2 e D) (HERZER *et al*., 1990) e que cepas virulentas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo B_2, e com menor freqüência ao grupo D, enquanto que a maioria das cepas comensais pertencem ao grupo A e B_1 (BINGEN et al., 1998). Clermont *et al* (2000) descreveu um método rápido e simples para se determinar os grupos filogenéticos de *E. coli*, o qual consiste na amplificação conjunta por PCR de uma combinação de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de função desconhecida de DNA (Figura IV).

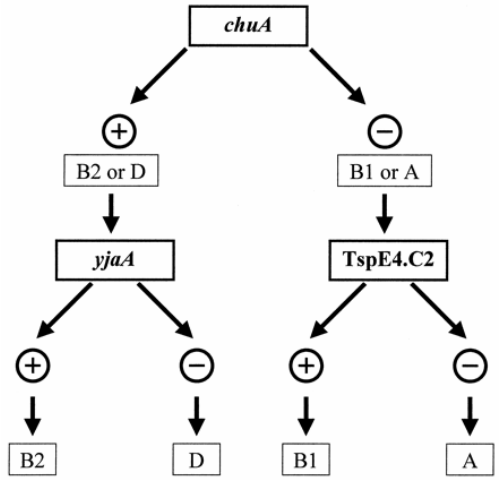


Figura IV: Diagrama do método de determinação do grupo filogenético de cada cepa de *Escheirichia coli*, a partir dos resultados de amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA *TSPE4.C2* (CLERMONT *et al*., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade genética entre as cepas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano pertencente a 43 municípios da 17ª e 18ª regionais de Saúde no Estado do Paraná e realizar um levantamento epidemiológico da região.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterização fenotípica dos isolados de *E.coli*, utilizando o Kit cromatogênico Colilert e testes bioquímicos convencionais;

- Caracterização genotípica, utilizando marcadores moleculares (BOX-PCR), com a finalidade de verificar a similaridade entre os isolados, comparando com as cepas padrões de *E. coli* diarreiogênicas;

- PCR-RFLP do gene ribossomal 16S de cepas representantes dos grupos obtidos a partir das análises de similaridade com o uso dos marcadores rep-PCR e das cepas padrões de *E. coli* diarreiogênicas;

- Identificar os grupos filogenéticos das cepas em estudo, verificando a possibilidade de ocorrência de cepas patogênicas nas amostras estudadas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARNES, D., GORDON, D. M. (2004). Coliform dynamics and the implications for source tracking. **Environ. Microbiol**. 6, 501-509.

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

BERGEY, J. G. H.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 787. 1994.

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

BINGEN, E., B. PICARD, N. BRAHIMI, S. MATHY, P. DESJARDINS, J. ELION, AND E. DENAMUR. (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J. Infect. Dis**. 177:642–650.

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

CARSON, C. A., B. L. SHEAR, M. R. ELLERSIECK, AND A. ASFAW. (2001). Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. **Appl. Environ. Microbiol**. 67,1503–1507.

CARVALHO DE MOURA, A. C., IRINO, K., VIDOTTO M. C. (2001). Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Dis**. 45, 173-181.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol**. 66, 4555-4558.

CONTE, V. D., COLOMBO, M., ZANROSSO, A. V., SALVADOR, M. (2004). Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas da região nordeste do Estado de Tio de Janeiro – BR. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 23, 190-194.

DEJARDINS, P., PICARD, B., KALTENBOCK, B., ELION, J., DENAMUR, E. (1995). Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population:

evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. **J. Mol. Evol**. 40, 440-448.

DOMBEK, P. E., L. K. JOHNSON, S. T. ZIMMERLEY, AND M. J. SADOWSKY. (2000).Use of repetitive DNA sequencing and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol**.66, 2572–2577.

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

EDBERG, S. C., E. W. RICE, R. J. KARLIN, AND M. J. ALLEN. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **J. Appl. Microbiol**. 88, 106S–116S., 539–548.

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

FEWTRELL, L., BARTRAM, J. Water quality: Guidelines, standards and health. **IWA Publ**., London. 2001.

FINLAY, B. B. & FALKOW, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. 61, 136-169.

FUJIOKA, R. S. Microbial indicators of water quality, p. 234-243. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (ed.), **Manual of Environmental Microbiology**, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 2002.

FURTADO, C., ADAK, G. K., STUART, M., WALL, P. G., EVANS, H. S.,CASEMORE, D. P. (1998). Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5. **Epidemiol. Infect**. 121, 109–119.

GELDREICH, E. E., FOX, K. R., GOODRICH, J. A., RICE, E.W., CLARK, R. M. (1992). Searching for a Water Supply Connection in the Cabool, Missouri Disease Outbreak of Escherichia coli 0157:H7. **Water Res. WATRAG**. 26, 1127-1137.

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

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

HERZER, P. J., INOUYE, S., INOUYE, M., WHITTAM, T. S. (1990). Phylogenetic distribuition of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolated of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**. 172, 6175-6181.

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

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. (2203). Populations genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. **Appl. Enviromen. Microbiol**. 69, 5306-5318.

JOHNSON, J. R., BROWN, J. J. (1998). Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* strains as revealed by polymerase chain reaction-based detection. **J. Infect. Dis**.177, 1120–1124

JOHNSON, J. R., STAPLETON, A. E., RUSSO, T. A., SCHEUTZ, F. S., BROWN, J. J., MASLOW, J. N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of papG. **Infect. Immun**. 65, 2153–2159

JOHNSON, J. R., GUAN, J., XU, S. R., CHEN, S., ODUMERU, J., GYLES, C. (2002). Development ofa procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animaland human sources. **Appl. Environ. Microbiol**. 68, 2690–2698.

LAUWS, F. J., RADEMARKER, J. L. W., BRUJIN, F. J. (1999). The Three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phitobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. **Annu. Rev. Phytopathol**. 37, 81-125.

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

LINDSKOG R. U & LINDSKOG P. A. (1988). Bacteriological contamination of water in rural areas: an intervention study from Malawi. **J. Trop. Med. Hyg.** 91, 1–7.

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

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

KOEUTH, T., VERSALOVIC, J., LUPSKI, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Res**. 5, 408-418.

KREADER, C. A. (1995). Design and evaluation of bacteroides DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.** 61, 1171-1179.

MACKENZIE, W. R., HOXIE, N.J., PROCTOR, M., GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.R., ADDISS, J.J., FOX, K.R.; ROSE, J.B., DAVIS, J.P. (2004). A

massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidiosis infection transmitted through a public water supply. **N. Engl. J. Med.** 331, 161–167.

MEAD P. S., SLUTSKER L., DIETZ V, MCCAIG L. F., BRESEE J. S., SHAPIRO C., GRIFFIN P. M., TAUXE R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis**. 5, 607–625

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

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

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

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

OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G. & GROISMAN, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature.** 405, 299-304.

PAYMENT P., RICHARDSON L., SIEMIATYCKI J., DEWAR R., EDWARDES M., FRANCO E.(1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumptionof drinking water meeting current microbiological standards. **Am. J. Public. Health.** 81,703–708.

PARVEEN, S., K. M. PORTIER, K. ROBINSON, L. EDMISTON, AND M. L. TAMPLIN.
(1999). Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol**. 65:3142–3147.

PERNA, N. T., PLUNKETT III, G., BURLAND, V., MAU, B., GLASNER, J. D., ROSE, D. J., MAYHEW, G. F., EVANS, P. S., GREGOR, J., KIRKPATRICK, H. A., POSFAI, G., HACKETT, J., KLINK, S., BOUTIN, A., SHAO, Y., MILLER, L., GROTBECK, E.J., DAVIS, N. W., LIM, A., DIMALANTA, E. T., POTAMOUSIS, K. D., APODACA, J., ANANTHARAMAN, T. S., LIN, J., YEN, G., SCHWARTZ, D. C., WELCH, R. A., BLATTNER, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**. Nature.** 409**,** 529–533.

PUPO, G. M., KARAOLIS, R., LAN, R. & REEVES, P. R. (1997). Evolutionary relationship among pathogenic and non pathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. **Infect. Immun**. 65, 2685-2692.

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

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

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

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

SCHLOTER, M., LEBUHN, M., HEULIN, T., HARTMANN, A. (2000). Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiol. Rev.**24, 647–660.

SELANDER, R. K. AND LEVIN, B. R. (1980). Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations**. Science**. 210, 545-547.

SEURINCK, S., W. VERSTRAETE, AND S. D. SICILIANO. (2003). Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. **Appl. Environ. Microbiol**. 69, 4942-4950.

SIGLER, V., PAUSTTI, L. (2006). Evaluation of denaturing gradient gel electtrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. **Environ. Microbiol**. 8, 1703-1711.

SOKURENKO, E.V., CHESNOKOVA, V., DYKHUIZEN, D. E., OFER, I., WU, X.R., KROGFELT, K.A., STRUVE, C., SCHEMBRI, M.A. AND HASTY, D. (1998). Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 95, 8922-8926.

SWERDLOW D.L., WOODRUFF B.A., BRADY R.C., GRIFFIN P.M., TIPPEN S., DONNELL H.D JR., GELDREICH E., PAYNE B.J, MEYER A. JR., WELLS J.G, ET AL. (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death**. Intern. Med**. 117, 812-9.

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

VAN ZIJL, W. J. (1966). Studies on diarrhoeal diseases in seven countriesby the WHO Diarrhoeal Diseases Advisory Team. **Bulletin of the World Health Organisation** 35, 249–261.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PRECIPITADOIER, D. A AND LANED J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol**. 173, 697-703.

WHO (2002). **The World Health Report 2002. World Health Organisation**, Geneva.

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

Diversity among strains of *Escherichia coli* isolated from drinking water in the northern region of Parana, Brazil, determined by BOX-PCR

C. A. S. Queiroz[1], F. G. Barcellos[2], J. S. Pelayo[1]

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

[2]Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970 Londrina, PR, Brazil.

Abstract

In this study, 139 strains of *Escherichia coli* were isolated from drinking water between February 2005 and February 2006. They were collected from different cities in the northern region of Parana State, Brazil. Due to the fact that fecal contaminants in water are considered a threat to human health and that the presence of pathogenic strains may contaminate water sources in this region, the genetic diversity of these isolated strains was studied. BOX-PCR and PCR-RFLP of the 16S ribosomal gene were used to study the genetic diversity among all the isolates, which were also classified into phylogenetic groups: A, B_1, B_2 and D. A high level of diversity among the isolates and clones in different counties or among clones from the same source of contamination was observed. Therefore, the rivers or aquifers that supply the cities may be pathogen carriers in this region. The classification of these strains into phylogenetic groups together with the analysis of genetic diversity based on BOX-PCR gave us an idea of the extent of pathogenic strains, since the percentage of strains belonging to the B_2 group was very low, 4.7% of the overall sample. This analysis thus demonstrates the importance of water in the spread of pathogenic microorganisms and the importance of the techniques used in studies of epidemiological surveys in micro-regions.

Key words: *Escherichia coli*, genetic diversity; BOX-PCR, drinking water.

INTRODUCTION

Escherichia coli is a facultative anaerobic microorganism belonging to the human and animal intestinal microbiota. This microorganism colonizes the gastrointestinal tract during the first hours of life, and afterward, *E. coli* and the host interact mutually (DRASAR & HILL**,** 1974). However, when the host is debilitated or immunosuppressed, commensal *E. coli* strains can cause infections in the host. Among the principal infections caused by *E. coli* are: extra-intestinal infections and enteric infections (NATARO & KAPER, 1998).

Besides human beings, cattle, pigs, dogs and birds in general are also considered reservoirs or sources of *E. coli,* (HANCOCK *et al*., 1998). Wide dissemination of *E. coli* by animals in the environment is believed to result in the contamination of water and food and consequently in human infection by this pathogen (RASMUSSEN *et al*., 2001; BARNES *et al*., 2004). *E. coli* is used as a quality control parameter for water for human use, since the presence of this microorganism can cause harm to human health (FARNLEITNER *et al*., 2000). However, the number of coliforms permitted varies according to the purpose of the water, that is, for drinking, bathing, agriculture and industrial processes according to Law no. 5.440, March 4, 2005 (BRASIL).

The transmission of virulence factors among the E. *coli* strains contributes to its pathogenicity, and increases its diversity in the environment (DONNENBERG & WHITTAM, 2001). According to some studies, pathogenic *E .coli* strains can derive from commensal strains by the acquisition of chromosomal or extra-chromosomal virulence genes (FINLAY & FALKOW, 1997; OCHMAN *et al*., 2000).

Bacteria species can have different genotypes and phenotypes reflecting a large variety of functional and structural diversity. This diversity scale, which can be called bacterial micro diversity, can be verified by high resolution molecular techniques. Molecular

studies of micro diversity are able to give very precise information which allows the understanding of microorganism functional groups, especially with regard to their relations with the environment and particular conditions (SCHLOTER *et al*., 2000).

The BOX-PCR method, which identifies the highly conserved repetitive DNA sequences present as many copies in Gram-negative and Gram-positive bacterial genomes, has been used widely in epidemiologic studies of *Enterobacteriaceae* species such as *E. coli* (DOMBECK *et* al., 2000; SEURINCK *et al*., 2003; SIGLER & PASUTTI, 2006). Also, according to Dombeck *et al*. (2000), it is possible to determine different sources of contamination using BOX-PCR.

Along with the analysis of the repetitive intergenic sequences, the analysis of *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) of the 16S ribosomal gene, can confirm the similarity of the isolates analyzed by rep-PCR at the genus or species level. This method consists of amplification and then digestion of rDNA with restriction enzymes, and is based on the principles that the restriction sites of rDNA are conserved according to phylogenetic patterns (LAUWS *et al*. 1999). The genome of certain phylogenetically identical organisms shows profound differences. *E. coli* K-12 and O157: H7 differ not only by the size of the genome, but also by a considerable number of chromosomal genes. Twenty-five percent of the genes present in enterohemorrhagic strains of *E. coli* O157: H7 are not found in non pathogenic strains of *E. coli* K-12, while 12% of the genes in the latter organism are absent in relation to the former. However, some genetic sequences such as the 16S ribosomal rDNA gene are identical in both organisms (PERNA *et al*., 2001).

The aim of this study was to analyze the diversity of *E. coli* strains isolated from water samples collected from different sources, from different cities of the northern region of Parana, Brazil, through the use of molecular markers (BOX–PCR) and by the

identification of the phylogenetic groups. Six standard *E. coli* strains were also analyzed for control.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

For this study, 139 strains of *Escherichia coli* were isolated from drinking water between February 2005 and February 2006. They were collected from different regions in the northern part of Parana State, Brazil. Water samples were collected from the network of municipal supplies, including deep wells, shallow wells, and sources of the municipalities and mines, belonging to the 17th and 18th Regional Health Districts in the state of Parana (Table 1), and six standard diarrheagenic strains used as control (enteropathogenic *E. coli* E2348/69; enteroaggregative *E. coli* O42 and 17-2; diffuse adherence *E. coli* C1845*;* enterohemorrhagic *E. coli* C7-88; enterotoxigenic *E. coli* H1047) (NATARO & KAPER, 1998).

Microbiological analysis of water samples

The chromogenic Colilert kit was used for quantification of total coliforms and *E. coli* (SOVEREIGN - BR), approved by the Standard Methods for the Examination of Water and Waste water (AMERICAN PUBLIC ASSOCIATION, 2004) and the Order of the Brazilian Ministry of Health, no. 518 (BRAZIL, 2004).

Isolation and identification of *Escherichia coli*

Aliquots were taken from the water samples positive for *E. coli*, and then seeded on MacConkey agar (Biobrás, MG, Brazil; MC) plates which were incubated at 37°C for 24 h. Three lactose-fermenting colonies and one non-lactose-fermenting colony were chosen randomly from each MC plate and then biochemically identified by means of EPM (TOLEDO *et al*., 1982_a), MILi (TOLEDO *et al*., 1982_b) and Simon's citrate. The

E. coli strains were stored in two ways: in nutrient agar (4°C) for the stock in use, and in brain heart infusion broth (BHI) (Difco, Michigan, USA) with 20% glycerin (-20°C) for permanent stock.

Extraction of DNA

DNA was extracted from bacteria that were grown in 3.0 mL of tryptone soy broth (TSB) (Difco, Michigan, USA), for 12 h at 37ºC with agitation as described by Kaschuk *et al*. (2006). All solutions used for DNA extraction were confirmed by 1% agarose gel electrophoresis (Difco, Michigan, USA), for 30 min at 80 V, using Low DNA Mass Ladder™ (Invitrogen™, Life Technologies) for comparison. Gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

PCR amplification with specific BOX A1R primer

The DNA of each bacterial isolate was amplified by PCR with primer BOX A1R (5`-CTACGGCAAGGCGACGTGACG-3`, Invitrogen™, Life Technologies) (VERSALOVIC *et al*., 1994) as described by KASCHUK *et al*. (2006). The reactions were carried out in a thermocycler (MJ Research Inc. PTC-100™), and amplified fragments were separated by horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gels, at 120V for 6 h. Gels were stained with ethidium bromide, visualized under UV light and photographed with a Kodak Digital Science 120 apparatus. The fingerprints obtained were analyzed by the Bionumerics program (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 3.50), UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) was used for the clustering algorithm analysis (SNEATH & SOKAL, 1973) along with Pearson's correlation coefficient with a tolerance of 2% (HASSAN *et al*., 2005).

PCR–RFLP of 16S ribosomal gene

The amplification of the 16S ribosomal gene was performed as described by Germano *et al*. (2006), using primers FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3`) and rP1 (5`-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3`) (WEISBURG *et al*., 1991). The amplification products were visualized in 1.5% agarose gels and compared with molecular weight standards (Low DNA Mass Ladder^{TM}; Invitrogen). The amplification product was used for digestion with the restriction enzymes *Rsa I*, *Mbo I* and *XmnI* as described by Laguerre *et al*. (1994). Each restriction reaction consisted of 0.5 µL of the enzyme (10 U μL^{-1}), 1.0 µL specific buffer (10X) for each enzyme, 6 µL of the PCR product, and 2.5 µL sterile water in a total volume 10 µL. The reaction mixtures were incubated at 37ºC for 2 h. The fragments were separated by 3% agarose gel electrophoresis at 120 V for 4 h. After electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide, visualized under UV light and photographed with a Kodak Digital Science 120 apparatus.

The phylogenetic groups

The phylogenetic groups to which the *E. coli* strains belonged were determined by the PCR-based method as described previously (CLERMONT *et al.*, 2000). The PCR reaction was performed in a thermocycler (PTC-200TM MT-Research). The reaction mixture was then subjected to 2% agarose gel electrophoresis at 80V for 40 min. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light and photographed with a Kodak Digital Science 120 apparatus. The primer pairs used were: ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3')/ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'); YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3')/YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3') and TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3')/TspE4C2.2 (5'-

CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'). The data of the three amplifications resulted in the assignment of the strains to phylogenetic groups as follows: *chuA*+, *yjaA*+, group B2; *chuA*+, *yjaA*-, group D; *chuA*-, TspE4.C2+, group B1; *chuA*-, TspE4.C2-, group A (CLERMONT *et al.*, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Diversity of the isolates considering the profile base BOX-PCR

One hundred and thirty-nine *E. coli* strains isolated from 116 water samples for human consumption were analyzed (untreated and treated) (Table 1) and six standard diarrheagenic strains used as control for the determination of diversity based on band profiles of PCR amplification products by of the respective regions and conserved in the genome (BOX *elements*). The dendogram generated with the grouping of all the isolates, shows a large diversity of genotypes among them. The different isolates were grouped into 11 distinctive groups (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K), considering that in group B, which includes the highest number of isolates, 12 subgroups were created (B_0, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_7, B_8, B_9, B_{10} e B_{11}) (Figure 1, Table 2).

In analyzing the profiles of each isolate, a similar level can be seen which is equal to or higher than 85% (Figure 1) corresponding to identical isolates (clones). The levels of similarity of each group and subgroup, the cities sampled, the number of samples, and isolates and clones by group are shown on Table 2.

The levels of similarities of groups A, B, C, D, E, H and J were found to be alike, about 50%, while the groups F, G and I have lower similarities of about 33% (Table 2). Group K, consisting of only one isolate, showed a low similarity with the other isolates, only 11%. Group B, subdivided into 12 subgroups, has 83 isolates from 81 water samples belonging to 26 different cities (Figure 1; Table 2).

From the total of 139 isolates of *E. coli* analyzed, 39 (including the standard strains) were identified as clones, a total of 18 distinctive clones (Table 3). Two or more isolates belonging to the same clone were observed as having their origin not only from the same water sample but from different samples, places and collection dates (Table 3).

Fourteen from the eighteens clones identified were isolated from samples of different cities (Table 3), showing a dispersion of these clones through superficial and underground waters. Clones 6 and 8 were isolated from different samples, but belong to the same city. However, clones 5 and 11 presented both isolates from the same samples (same city) and isolates from different cities.

Although most of the clones identified belonged to different samples, some were also found that belonged to the same sample. Clone 17, for example, showed 3 isolates belonging to the same water sample (Table 3). It was observed that these isolates, even though genotypically identical, were distinct as far as lactose metabolism in culture (data not presented).

With exception of clones 7, 11 and 13, which include isolates from cities in the 17th district, all the other clones were isolated from counties belonging to the 18th district. Therefore, most of the clones are located in a limited area in the northern part of Parana.

As to the date on which these clones contaminate the population's water supply, a kind of seasonality is noticed, that is, a specific time of the year. This period is from September 2005 to February 2006, a time with a high rainfall level in the region. Besides this, the presence of clones was observed in samples collected on the same date (clone 15) and on close dates (clone 18), as well as samples collected on distant dates (Table 3).

Finally, the suitability of the technique used was demonstrated for the diversity study when clone 12 was observed, since this one is constituted of two control strains of aggregative *E. coli*, that is, genotypically identical. Thus, they presented the same genomic profile based on the BOX-PCR technique.

PCR-RFLP of ribosomal 16S gene

This technique has been used mainly for microbial diversity study in various aspects, as in different soils (MOCALI *et al*., 2003) and diazotrophic bacteria characterization (CRUZ *et al*., 2001), among others. The PCR-RFLP analysis of the ribosomal 16S gene can identify bacterial isolates at the genus and species level, being, therefore, widely used for the taxonomic study (RODAS *et al*., 2003).

A representative sample of isolates belonging to the groups A-K, were submitted to PCR-RFLP analysis of the ribosomal 16S gene using the *MboI*, *RsaI* and *XmnI* enzymes. The chosen isolates represented all the groups previously analyzed by the BOX-PCR technique. In the PCR-RFLP analysis of the ribosomal 16S gene, the electrophoretic profiles obtained with all three enzymes, were compared among themselves, including the *E. coli* control strains, allowing the recognition of an identical profile for all the isolates (data not presented).

Despite the high diversity displayed in the BOX-PCR analysis (Figure 1), all the isolates initially identified as *E. coli* by the biochemical characteristics, had their identification confirmed through the restriction analysis of the 16S ribosomal gene. According to Perna *et al*. (2001), the analysis of the 16S rDNA gene in *E. coli* strains eliminates the possibility of a classification mistake or the presence of a similar microorganism in an *E. coli* sample.

Thus, the probability of a mistake in the identification by means of biochemical tests was dismissed.

Phylogenetic groups

Herzer *et al*. (1990), using the *multilocus enzyme electrophoresis* technique in a collection of 72 *E. coli* reference strains (ECOR) identified four main phylogenetic groups, A, B_1, B_2 and D. Later, Desjardins *et al*. (1995), using various molecular markers, confirmed the division of the *E. coli* strains in these four main phylogenetic groups. A phylogenetic analysis has indicated several origins for various natural populations of *E. coli* strains and *Shigella* (PUPO *et al*., 2000).

The phylogenetic group of each of the isolates was determined as described by Clermont *et al.* (2000).

The most representative phylogenetic group among the study strains (including the control strains) was group D, with 48.6% of the isolates (73) from our samples. Group B_1 represented 40.7% (61), while group A and group B_2 represented 6% (9) and 4.7% (7), respectively (data not presented).

According to Duriez *et al.* (2001), the strains belonging to group B_2 have a larger potential for pathogenicity in relation to other groups. This latter study showed that strains belonging to group B_2 have a larger percentage of virulence factors than the other groups. Therefore, in our study, it was observed that the percentage of the possibly pathogenic strains belonging to group B_2, represent only 4.7% of the total. Besides this, in the study by Duriez *et al*. (2001), a comparison was made between the pathogenic and commensal strain collections demonstrating that the presence of the strains belonging to group B_2 is larger in the pathogenic one.

Hence, even though the source or the reservoir which contaminated our samples is not known, a hypothesis to consider is that our isolates are mostly commensal.

Correlation between BOX-PCR and phylogenetic groups

It was possible to identify some clones using BOX-PCR analysis. The clones identified were from the same sample, samples from the same city and samples from different cities as well as. As the classification of the isolates into phylogenetic groups was made, it was clear that most of the isolates considered clones belong to the same phylogenetic group (Table 3).

Only clones 3, 5, 14 and 18 showed differences related to the classification of the phylogenetic group. A possible explanation for these differences is in the mechanisms of genomic diversification of *E. coli* strains, in addition to the occurrence of horizontal gene transfer and mutations (ELENA *et al*., 2005). Elena *et al*. (2005) conducted a study on the genomic divergence in *E. coli* strains, where, in time, the genomic divergence rate was estimated for the *E. coli* B, K-12 and O157 H:7 strains.

A high diversity was observed among the *E. coli* strains isolated from water in this study. Through the BOX-PCR technique, it was possible to identify the diversity existing in the water samples of different counties, samples from the same county and even isolates from the very same sample. The presence of circulating clones in different counties, that is, clones that could come from the same contamination source was also observed. Therefore, it is possible that water from rivers or underground water disseminate possible pathogenic strains into surrounding counties.

The classification of strains into phylogenetic groups allowed us to conclude that most of the *E. coli* isolates from samples of the counties studied are probably commensal, decreasing the threat of the occurrence of diarrhea outbreaks due to *E. coli* in these

counties. It was also possible to demonstrate the importance of water in the dissemination of microorganisms and the possibility of using the BOX–PCR technique in the tracing of clones, making it possible to identify the source of contamination or even making regional epidemiological surveys, allowing better planning policies for prevention and control of epidemics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CAPES and the Secretaria Estadual da Saúde/PR for financial support. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

REFERENCES

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

Barnes D & Gordon DM (2004) Coliform dynamics and the implications for source tracking. *Environ Microbiol* **6:** 501-509.

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

Clermont O, Bonacorsi S & Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66:** 4555-4558.

Cruz, LM, Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Dobereiner J, Pedrosa FO (2001) 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus*). *Appl Environ Microbiol* **67:** 2375-2379.

Desjardins P, Picard B, Kaltenbock B, Elion J & Denamur E (1995) Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. *J Mol Evol* **40:** 440-448.

Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST & Sadowsky MJ (2000) Use of repetitive DNA sequencing and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* **66:** 2572–2577.

Donnenberg, MS & Whittam TS (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107:** 539-548.

Duriez P, Clermont O, Banacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B & Denamur E (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol* **147:** 1671-1676.

Drasar BS & Hill MJ (1974) Human intestinal flora. London, Un. Kingdom-Academic Press Ltd **7:** 36–43.

Elena FS, Whitittam ST, Winkworth LC, Riley AM & Lenski ER (2005) Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal and variation in mutation rates. *Int Microbiol* **8:** 271-278.

Finlay BB & Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microb Mol Biol Rev* **61:** 136-169.

Germano MG, Menna P, Mostasso FL, Hungria M (2006) RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legumes species. *Int J Syst Evol Microbiol* **56:** 217-229.

Hassan WM, Wang SY & Ellender RD (2005) Methods to increase fidelity of Repetitive Extragenic Palindromic PCR fingerprint-based bacterial source tracking efforts. *Appl Environ Microbiol* **71:** 512-518.

Hancock D, Besser T, Rice D, Ebel D, Herriott D & Carpenter L (1998) Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* **35:** 11–19.

Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribuition of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172:** 6175-6181.

Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS & Campo RJ (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in southern Brazil. *Appl Soil Ecol* **32:** 210-220.

Laguerre G, Allard MR, Revoy F & Amarger N (1994) Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **60:** 56–63.

Lauws FJ, Rademarker JLW & Brujin FJ (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu Rev Phytopathol* **37:** 81-125.

Mocali S, Bertelli E, Di Cello F, Mengoni A, Sfalnga A, Villiani F, Caciotti A, Tegli S, Surico G & Fani R (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res Microbiol* **154:** 105-114.

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

Ochman H, Lawrence JG & Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405:** 299-304.

Perna NT, Plunkett III G, Burland V *et al*. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**.** *Nature* **409:** 529–533.

Pupo GM, Lan R & Reeves PR (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 10564-10572.

Rasmussen M & Casey T (2001) Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Crit Rev Microbiol* **27:** 57–73.

Rodas AM, Ferrer S & Pardo I (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* **26:** 412-422.

Seurinck S, Verstraete W & Siciliano SD (2003) Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. *Appl Environ Microbiol* **69:** 4942-4950.

Schloter M, Lebuhn M, Heulin T & Hartmann A (2000) Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol Rev* **5:** 647–660.

Sigler V & Paustti L (2006) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. *Environ Microbiol* **8:** 1703-1711.

Sneath PBA & Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy- the Principles and Practice of Numeral Classification. W.H. Freeman, San Francisco, 573 pp.

Toledo MRF, Fontes CF & Trabulsi LR (1982_a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S, uréase e triptofano-desaminase. *Rev Microbiol* **13:** 309-315.

Toledo MRF, Fontes CF & Trabulsi LR (1982_b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Rev Microbiol* **13:** 230-235.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173:** 697-703.

Versalovic J, Schneid M, Bruijn FJ & Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5:** 25–40.

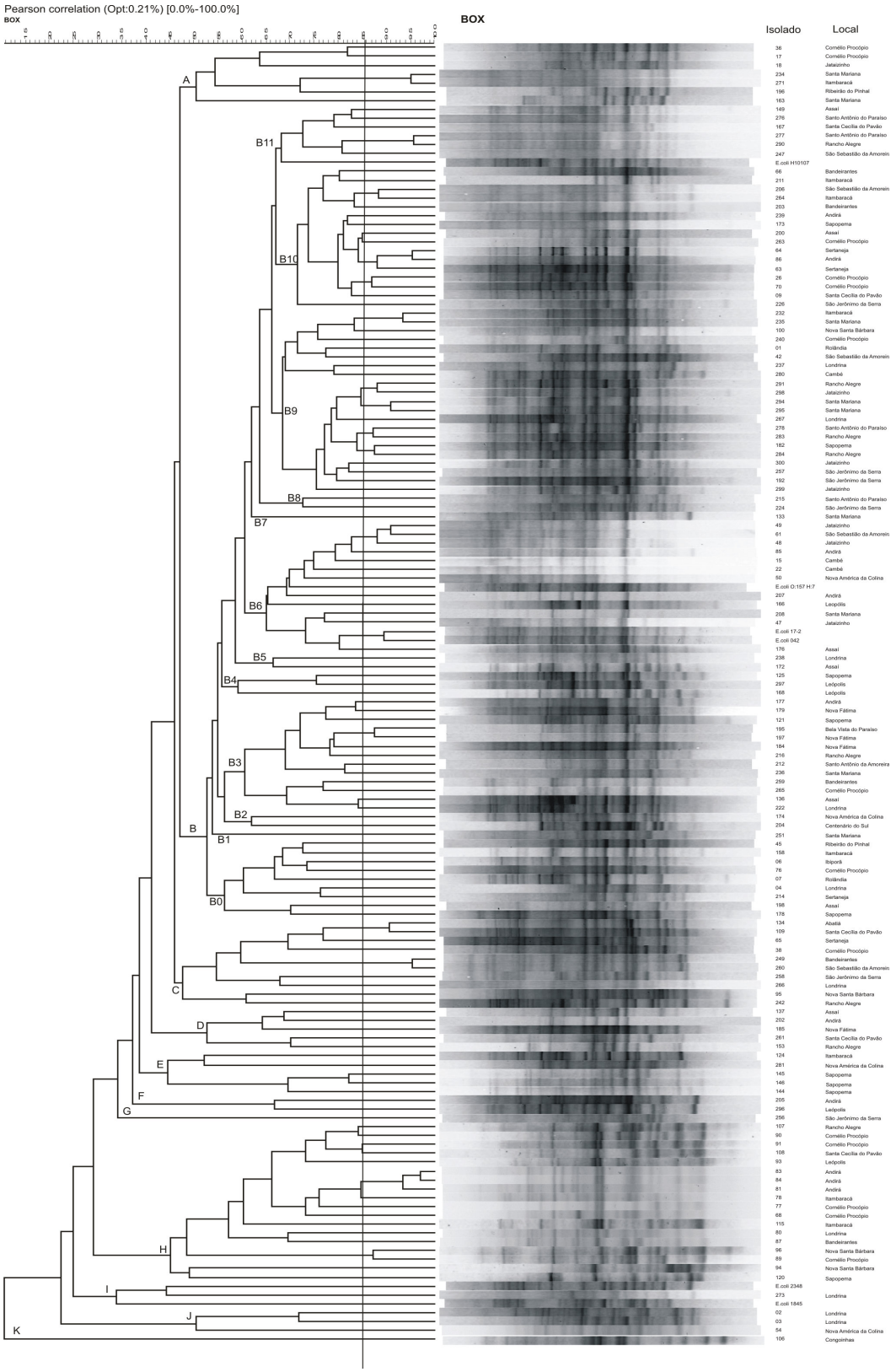


Figure 1: Fingerprint BOX-PCR of 139 isolates and 6 control strains of diarrheagenic *E. coli*. The groups were made using Pearson's correlation coefficient and UPGMA.

Table 1: Numbers of samples versus isolates between the cities of collection, belonging to 18th and 17th Regional Health Districts.

City of collection	Regional health	No.	
		water samples	isolates by city
Abatiá	18º	1	1
Andirá	18º	6	9
Assaí	18º	6	7
Bandeirantes	18º	4	4
Bela Vista do Paraíso	17º	1	1
Cambé	17º	3	3
Centenário do Sul	17º	1	1
Congoinhas	18º	1	1
Cornélio Procópio	18º	9	14
Ibiporã	17º	1	1
Itambaracá	18º	8	8
Jataizinnho	17º	5	7
Leópolis	18º	5	5
Londrina	17º	8	10
Nova América da Colina	18º	5	6
Nova Fátima	18º	3	4
Nova Santa Bárbara	18º	2	4
Rancho Alegre	18º	8	8
Ribeirão do Pinhal	18º	2	2
Rolândia	17º	2	2
Santa Cecília do Pavão	18º	4	5
Santa Mariana	18º	7	7
Santo Antônio do Paraíso	18º	4	4
São Jerônimo da Serra	18º	6	6
São Sebastião da Amoreira	18º	6	6
Sapopema	18º	6	9
Sertaneja	18º	2	4
Total		116	139

Table 2: Analysis of the dendrogram of BOX-PCR of 139 isolates and 6 control strains of *E. coli*.

Groups	Sub-groups	Similarity[a]	City	No.		
				samples	isolates[b]	clones[c]
A		50%	6	7	7	1
B		52%	26	81	92	2 a 13
	B0	53%	9	9	9	*
	B1	54%	1	1	1	*
	B2	55%	2	2	2	*
	B3	56%	11	13	13	13
	B4	56%	2	3	3	*
	B5	60%	2	2	2	*
	B6	61%	11	14	15	11 and 12
	B7	62%	1	1	1	*
	B8	64%	2	2	2	*
	B9	68%	14	21	21	6,7,8,9 and 10
	B10	72%	10	15	16	3,4 and 5
	B11	68%	6	7	7	2
C		47%	8	10	10	14 and 15
D		54%	5	5	5	*
E		45%	3	3	5	*
F		33%	2	2	2	*
G		33%	1	1	1	*
H		45%	10	14	18	16,17 and 18
I		33%	3	1	3	*
J		50%	2	2	3	*
K		11%	1	1	1	*

a Smaller similarity of the group or sub-group
b They included the control strains
c No. of clones of each group or sub-group
* Absence clones

Table 3: Identification and classification in phylogenetic groups of clones.

Clones	Number		Cities of collection	Date of collection	Phylogenetic Groups
	isolates	samples[a]			
1	234	29	Santa Mariana	12/15/05	D
	271	10	Itambaracá	02/07/06	D
2	277	7	Santo Antônio do Paraíso	02/15/06	A
	290	3	Rancho Alegre	02/21/06	A
3	206	22	São Sebastião da Amoreira	10/24/05	D
	264	6	Itambaracá	01/25/06	B1
4	200	23	Assaí	11/16/05	B1
	263	12	Cornélio Procópio	01/25/06	B1
5	64	5 [c]	Sertaneja	08/23/05	D
	86	5 [c]	Sertaneja	08/23/05	B1
	63	35	Andirá	08/19/05	D
6	26	10	Cornélio Procópio	8/3/2005	B1
	70	29	Cornélio Procópio	03/14/05	B1
7	291	13	Rancho Alegre	02/21/06	B1
	298	1	Jataizinho	02/23/06	B1
8	294	14	Santa Mariana	02/23/06	B1
	295	16	Santa Mariana	02/23/06	B1
9	278	1	Santo Antônio do Paraíso	01/17/06	D
	283	16	Rancho Alegre	02/21/06	D
10	182	11	Sapopema	10/18/05	B1
	284	16	Rancho Alegre	02/21/06	B1
11	49	24 [c]	Jataizinho	08/15/05	B1
	61	24 [c]	Jataizinho	08/15/05	B1
	48	9	São Sebastião da Amoreira	08/23/05	B1
12	E. coli 17-2		reference		A
	E. coli 042		reference		A
13	195	31	Bela Vista do Paraíso	08/23/05	B1
	197	16	Nava Fátima	08/11/05	B1
14	134	15	Abatiá	10/24/05	B1
	109	8	Santa Cecília do Pavão	08/15/05	A
15	249	2	Bandeirantes	01/11/06	D
	260	2	São Sebastião da Amoreira	01/11/06	D
16	91	32	Cornélio Procópio	09/21/05	D
	108	8	Santa Cecília do Pavão	08/15/05	D
17	83	33 [c]	Andirá	19/09/05	B1
	84	33 [c]	Andirá	19/09/05	B1
	81	33 [c]	Andirá	19/09/05	B1
18	96	5	Nova Santa Bárbara	20/09/05	D
	89	32	Cornélio Procópio	21/09/05	A

[a] Each city has a numbering of their own samples
[c] isolated from the same sample