



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO ALFONSO SCHÜROFF

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA*
COLI ENTEROAGREGATIVA EM AMOSTRAS DE ÁGUA
DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO NA REGIÃO NORTE
DO ESTADO DO PARANÁ**

PAULO ALFONSO SCHÜROFF

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA EM AMOSTRAS DE ÁGUA DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ

Defesa de dissertação apresentado 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
2016

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

Schüroff, Paulo Alfonso.

Identificação e caracterização de *Escherichia coli* enteroagregativa em amostras de água destinadas ao consumo humano na região Norte do estado do Paraná / Paulo Alfonso Schüroff. - Londrina, 2016.

42 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. EAEC - Teses. 2. *Escherichia coli* - Teses. 3. Água - Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

PAULO ALFONSO SCHÜROFF

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA EM AMOSTRAS DE ÁGUA DESTINADAS AO
CONSUMO HUMANO NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Defesa de dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de março de 2016

DEDICO

Por sempre estarem ao meu lado nessa longa jornada de estudos, nos momentos felizes e difíceis, dedico este trabalho especialmente a meu pai e minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelos dons da sabedoria e inteligência. Por dar-me perseverança sempre.

À minha querida mãe, Andreia Camargo Schüroff, por todo o carinho e apoio nestes valiosos anos de estudo. Seus ensinamentos sempre me guiarão.

Ao meu pai, Alfonso Schüroff, por sempre acreditar em meu potencial e me ajudar em tudo que eu precisei.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, pelos ensinamentos, pela paciência e pelos inúmeros momentos de alegria compartilhados.

À minha irmã Hana Paula, por sempre me apoiar e me ajudar em tudo que eu precisei.

À minha irmã Hana Karoline que mesmo não estando aqui conosco faz-se presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Sérgio P. Dejato da Rocha pelas inúmeras ajudas prestadas no decorrer deste trabalho.

À Nicole minha amiga, pelo apoio e companheirismo nesses anos de laboratório.

À minha amiga Tatiane pelas inúmeras conversas e auxílios com metodologias e experimentos deste trabalho.

À minha amiga Angélica por me ajudar com os experimentos e traduções de artigos e resumos de congressos.

Ao pessoal do laboratório, Anahí, Carol, Taynara, Jeanne, Antônio e Claci pela amizade, bate-papos e pelos tantos momentos alegres.

Aos meus amigos da Biomed 11 (Lab-Zeppelin ®): Leonardo, Bruno, Glauco, Mauricio, Gilberto Plack e Vinícius, pela amizade, companheirismo e risadas nestes últimos quatro anos.

À Rosiane, minha amiga, pelas idas às festas de república, passeios e numerosas risadas nestes últimos anos.

A Fundação Araucária pelo financiamento do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigado!**

*“Apenas a vontade de lutar pode
mudar o nosso mundo”*

Linked Horizon

SCHÜROFF, Paulo Alfonso. **Identificação e caracterização de *Escherichia coli* enteroagregativa em amostras de água destinadas ao consumo humano na região Norte do estado do Paraná.** 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) têm sido um patógeno comumente associado a pacientes HIV positivos, viajantes e presente em surtos alimentares, contudo sua pesquisa em fontes de água ainda é bastante escassa. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo investigar e caracterizar o patótipo EAEC em 750 isolados de *E. coli* oriundos de 250 amostras de água destinadas ao consumo não tratadas e coletadas de 21 municípios na região Norte do estado do Paraná entre os meses de janeiro de 2012 a dezembro de 2014. No teste de adesão, 84% dos isolados foram classificados como EAEC por apresentarem o padrão de aderência agregativo (AA) nas células HEp-2. Dos quatro genes de diagnóstico pesquisados (*aatA*, *aggR*, *aaiA* and *aaiC*), apenas o *aaiC* foi encontrado em 7,2% dos isolados. No teste de formação de biofilme, 72,4% dos isolados apresentaram formação de biofilme e destes 95,6% pertenciam ao patótipo EAEC. Os 18 isolados positivos ao *aaiC* foram também testados para oito genes de virulência associados com EAEC, resistência a antimicrobianos e análise filogenética. Apenas três genes de virulência *astA* (72,2%), *shf* (22,2%) e *pic* (5,6%) foram detectados. Resistência foi verificada apenas para os antibióticos ampicilina (38,9%) e cefalotina (11,1%). Na análise filogenética, os filogrupos B1(61,1%) e A (22,2%) foram os mais prevalentes. Os resultados encontrados mostram que a água para consumo é um importante reservatório para EAEC em nosso meio ambiente. O teste de adesão em células epiteliais ainda é de grande importância na identificação deste patótipo e a pesquisa de novos marcadores para detectar EAEC é necessária. Além disso, a presença de diferentes perfis de virulência e características fenotípicas em cepas EAEC é de grande preocupação para a saúde pública, principalmente por estas cepas poderem ser transmitidas diretamente para humanos, animais e alimentos.

Palavras-Chave: EAEC. Água para consumo. Adesão agregativa. Genes de diagnóstico. Risco à saúde pública.

SCHÜROFF, Paulo Alfonso. **Identification and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* in drinking water supplies of North Paraná State**. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathogen commonly associated with HIV-positive patients, travelers and present in food poisoning outbreaks, but it has not been greatly researched in water sources. Therefore, the present work aimed to investigate and characterize the EAEC pathotype in 750 *E. coli* isolates from 250 samples of drinking water untreated collected from 21 municipalities in north of Paraná State between January 2012 and December 2014. In the adhesion test, 84% of the isolates were classified as EAEC for presenting the aggregative adherence (AA) pattern in HEp-2 cells. Of the four diagnostic genes researched (*aatA*, *aggR*, *aaiA* and *aaiC*), only *aaiC* was found in 7.2% isolates. In the biofilm formation test 72.4% isolates presented biofilm formation and of these 95.6% belonged to EAEC pathotype. The 18 *aaiC* positive isolates were tested for eight virulence genes associated with EAEC, antimicrobial resistance and phylogenetic analysis. Only the virulence genes *astA* (72,2%), *shf* (22,2%) and *pic* (5,6%) were detected. Resistance was verified only for the antibiotics ampicillin (38,9%) and cephalothin (11,1%). In phylogenetic analysis, the phylogroups B1(61.1%) and A (22.2%) were the most prevalent. The results found show that drinking water is an important reservoir for EAEC in our environment. The adhesion test on epithelial cells is still of great importance in identifying this pathotype and the research of new molecular markers to detect EAEC is necessary. In addition, the presence of different virulence profiles and phenotypic characteristics in EAEC strain is of great concern for public health, mainly because these strains may be transmitted directly to humans, animals and foods.

Key words: EAEC. Drinking water. Aggregative adhesion. Diagnostic genes. Risk to public health.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	11
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	11
2.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA NA ÁGUA.....	17
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	TRABALHO CIENTÍFICO	28
5.1	IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENTEROAGGREGATIVE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN DRINKING WATER SUPPLIES OF NORTH PARANÁ STATE, BRAZIL.....	28
6	CONCLUSÃO	42

1. INTRODUÇÃO

Algumas cepas de *Escherichia coli* podem causar danos à saúde de indivíduos saudáveis, resultando em diversas síndromes como: gastroenterite, infecção do trato urinário, sepse e meningite. Na classe de *E. coli* causadoras de infecção intestinal destacamos a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) na qual apresenta uma grande relevância epidemiológica.

EAEC é um patógeno emergente que está associado a casos de diarreia aguda e persistente. Sua patogenicidade está relacionada a três fatores: abundante aderência à mucosa intestinal, formação de biofilme e produção e liberação de toxinas. A infecção por EAEC pode resultar desde uma diarreia aquosa branda até casos de crescimento debilitado e subdesenvolvimento mental em crianças. A transmissão de EAEC em humanos pode ocorrer principalmente devido ao contato com fezes, alimentos ou água contaminada.

A água é um componente essencial à vida, já que nenhum organismo consegue sobreviver na sua completa ausência. Ainda hoje, grande parte da população brasileira não tem acesso a fontes de água tratada, recorrendo-se assim a fontes alternativas de abastecimento pouco confiáveis como poços e minas.

Com a utilização destas fontes alternativas ao consumo, também aumentam os riscos de contaminação com cepas patogênicas de *E. coli*, como a EAEC. Devido aos possíveis perigos acarretados à saúde pública por este patotipo, são necessários estudos que evidenciem a distribuição e a frequência destas cepas em ambientes aquáticos, além das características de virulência, no sentido de melhor conhecer a epidemiologia dessas infecções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo que faz parte da microbiota intestinal humana e animal proporcionando benefícios para seus hospedeiros. Entretanto, algumas cepas dessa espécie podem causar infecções no sistema urinário, no sistema nervoso central, sepse e gastroenterites (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli associada a infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em oito patotipos, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes que causam, os sorotipos, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares. Esses grupos de DEC 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. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012).

2.2. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

EAEC são identificadas por sua habilidade em produzir o padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais, como em células HEp-2 e HeLa. Inicialmente este padrão foi descrito por Nataro et al. (1987) em um estudo examinando diferentes padrões de adesão de cepas de *E. coli* obtidas de crianças chilenas com diarreia. O padrão AA é definido como uma ligação íntima das bactérias as células epiteliais em uma forma de “tijolo empilhado”, na qual podem incluir bactérias mostrando adesão predominantemente na lamínula e/ou predominantemente nas células epiteliais (NATARO et al., 1987).

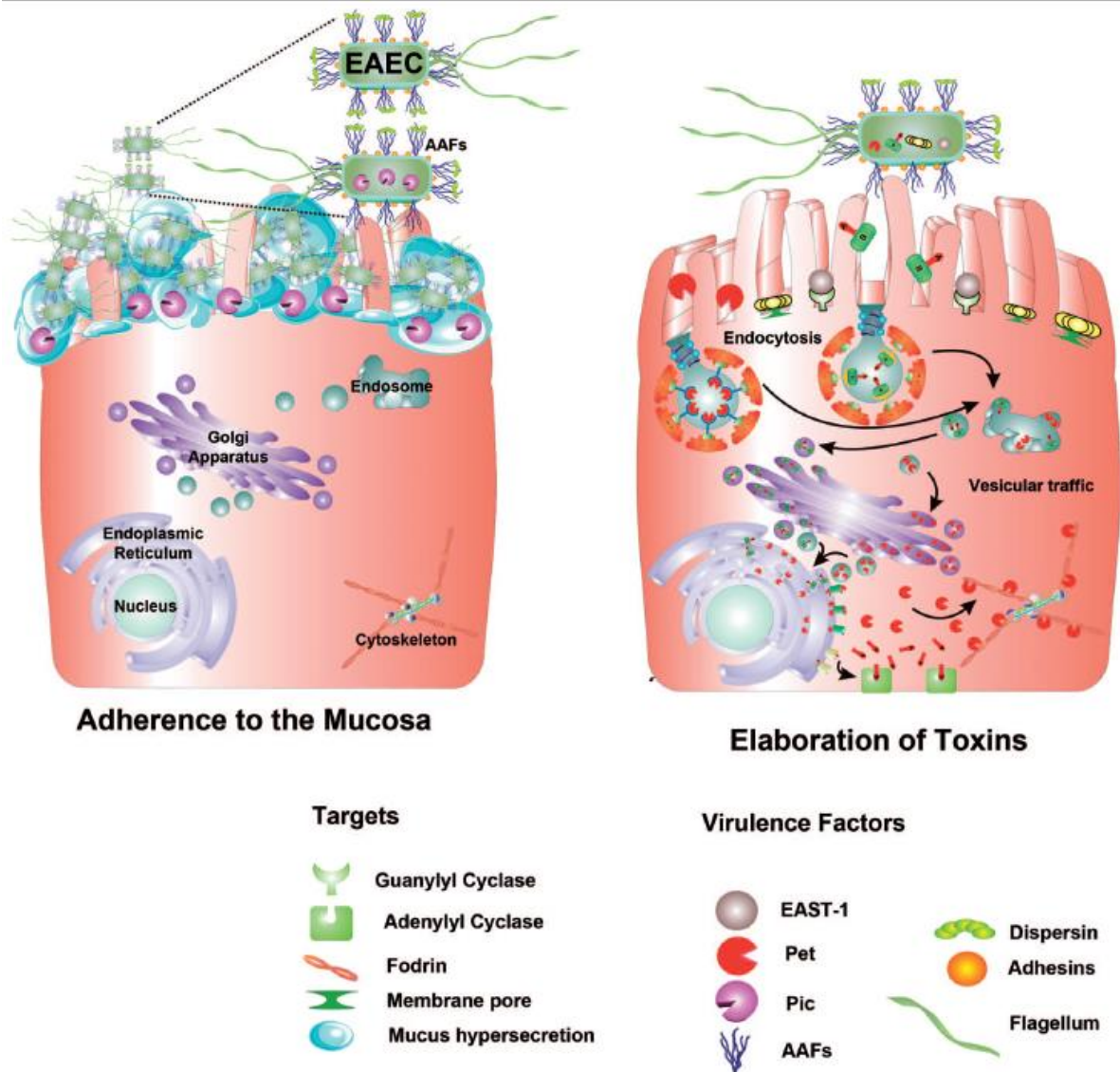
Estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil (ARAUJO et al., 2007; DIAS et al., 2016; LIMA, A. A. et al., 1992) e em outros países (BEN SALEM-

BEN NEJMA et al., 2014; OPINTAN et al., 2010; SARANTUYA et al., 2004) classificam EAEC como o patótipo mais comumente isolado de crianças com diarreia. Estes trabalhos colocam a EAEC como um importante patógeno emergente, na qual apresenta uma associação significativa com casos de diarreia aguda e persistente (HUANG et al., 2006; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

EAEC também têm sido encontrada em fezes de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (GASSAMA-SOW et al., 2004; MEDINA et al., 2010), associada à diarreia do viajante em adultos que retornaram de viagens oriundas de países subdesenvolvidos (HUANG et al., 2007; PASCHKE et al., 2011) e presente em surtos de diarreia ocasionados pela ingestão de alimentos contaminados (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). Normalmente os sintomas associados a infecção por EAEC incluem diarreia aquosa e ocasionalmente diarreia mucoide, náuseas, anorexia, febre de baixo grau, ruídos intestinais e tenesmo (OKHUYSEN et al., 2004). Casos crônicos da infecção por EAEC podem levar a desnutrição, além do crescimento debilitado e subdesenvolvimento mental em crianças (STEINER et al., 1998).

A patogenicidade da infecção por EAEC ainda não está totalmente elucidada. Os dados acumulados de diversos estudos têm sugerido três estágios na sua patogênese: (1) abundante aderência à mucosa intestinal, (2) formação de biofilme e (3) produção e liberação de toxinas (Figura 1) (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Figura 1 – Representação dos estágios da patogênese por EAEC: (1) aderência à mucosa intestinal e (2) elaboração de toxinas.



Fonte: Navarro-Garcia; Elias (2011)

A Ligação à mucosa intestinal é um passo essencial da colonização e produção de doença por EAEC (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Diversos estudos demonstram que o padrão AA é associado principalmente com a presença de adesinas de origem fimbrial, na qual destacamos *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs) que incluem cinco principais variantes, AAF/I (NATARO et al., 1992), AAF/II (CZECZULIN et al., 1997), AAF/III (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002), AAF/IV (BOISEN et al., 2008) e AAF/V (JONSSON et al., 2015). Outros fatores também contribuem para o processo de adesão e colonização, dentre eles temos a proteína anti-agregativa designada de dispersina, codificada pelo gene *aap* (*anti-aggregation protein dispersin*). Esta proteína atua diminuindo a autoagregação bacteriana, permitindo assim a sua dispersão ao longo da mucosa intestinal (SHEIKH et al., 2002). O seu transporte para fora da célula bacteriana é realizado por uma proteína transportadora, codificada pelo gene *aatA* (*anti-aggregation protein transporter*), (anteriormente conhecido como sonda CVD432 ou sonda AA) (BAUDRY et al., 1990; NISHI et al., 2003).

Dentre os genes conhecidos o *aggR* (*aggregative adherence regulator*) é considerado importante na patogênese e nas propriedades agregativas de EAEC, sendo um importante ativador transcricional que promove a expressão de fatores de virulência tanto plasmidiais quanto cromossomais, incluindo as AAFs e a dispersina (DUDLEY et al., 2006). Diversos trabalhos têm sugerido o termo EAEC típica (tEAEC) para cepas que apresentam o padrão AA e o gene regulador *aggR* e EAEC atípica (aEAEC) para as cepas AA que não apresentam o *aggR* (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; MORIN et al., 2013).

tEAEC compreende a um grupo de cepas potencialmente patogênicas, que têm sido associada a vários casos de diarreia em todo o mundo (OPINTAN et al., 2010; RAJENDRAN et al., 2010), sendo encontrada principalmente em reservatório humano e podendo ser transmitida por contato fecal-oral, alimentos e água contaminada (JIANG et al., 2002). aEAEC são cepas bastante prevalentes em vários continentes, sendo isoladas de diversas fontes, tais como humanos e animais e água (TOKUDA et al., 2010; VIJAY et al., 2015). Embora aEAEC tenha sido identificada em animais, estes não são considerados como uma fonte ou reservatório para a infecção humana (OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Outra característica importante da EAEC é a sua habilidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. A formação do biofilme é um importante fator que contribui para a persistência da infecção bacteriana, permitindo com que a bactéria evada do sistema imune local, além de tornar os microrganismos mais resistentes a agentes antimicrobianos (TOKUDA et al., 2010; WINGENDER; FLEMMING, 2011). Ensaio para quantificar e detectar a formação de biofilme surgiram como possíveis métodos para a triagem de cepas EAEC patogênicas (BANGAR; MAMATHA, 2008; WAKIMOTO et al., 2004). Além dos ensaios fenotípicos, o gene *shf* (*Shigella flexneri* homologue) tem se mostrado intimamente relacionado com a produção de biofilme na cepa de referência EAEC 042 (O44: H18) (FUJIYAMA et al., 2008).

Uma vez que o biofilme foi estabelecido, mais danos ao epitélio intestinal são descritos, na qual incluem a liberação de toxinas bacterianas (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Dentre estas toxinas, temos a Pet (*plasmid-encoded toxin*), na qual cliva o citoesqueleto dos enterócitos gerando dano a mucosa intestinal (ESLAVA et al., 1998). Pic (*protein involved in intestinal colonization*) é uma mucinase que interfere na integridade da membrana da mucosa e induz a hemaglutinação. (HENDERSON et al., 1999). Por último temos o gene *astA*, associado a expressão da EAST1 (*EAEC heat-stable enterotoxin*), que causa aumento da secreção de cloro, através do aumento das contrações intracelulares de GMP cíclico, e tem sido associado com diarreia aquosa (MENARD; DUBREUIL, 2002).

Para se avaliar melhor as características de EAEC outros testes como a filogenia e sensibilidade a antimicrobianos podem ser utilizados.

Análises filogenéticas têm mostrado que cepas de *E. coli* são classificadas em sete principais grupos, A, B1, B2, C, D, E e F. A distribuição em grupos filogenéticos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas, além de contribuir para o entendimento de como os genes de virulência são adquiridos (CLERMONT et al., 2013). Cepas de *E. coli* extraintestinais normalmente pertencem aos filogrupos B2 e D, enquanto que cepas de *E. coli* comensais frequentemente pertencem ao grupo A (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Em contra partida, devido a sua heterogeneidade

genética, cepas EAEC são consideradas filogeneticamente diversas, podendo estar presentes em todos os filogrupos conhecidos (OKEKE et al., 2010).

Resistência a antimicrobianos é uma importante propriedade para a classificação de EAEC patogênica. EAEC que apresentam altas taxas de resistência a várias drogas têm sido reportadas em diversos estudos (BANGAR; MAMATHA, 2008; OUNDO et al., 2008). Em ambientes aquáticos cepas de *E. coli* multirresistentes normalmente são encontradas em águas residuais, principalmente as provindas de ambientes hospitalares (REBELLO; REGUA-MANGIA, 2014). *E. coli* multirresistentes também têm sido obtidas de fontes aquáticas destinadas ao consumo humano (TALUKDAR et al., 2013)

Com relação ao diagnóstico de EAEC, o método ouro para a identificação de cepas deste patotipo ainda continua sendo o teste de adesão em culturas de células epiteliais (NATARO et al., 1987). Porém, nos últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa ao ensaio de adesão, o qual é caro, consome tempo e requer cultura de células e infra-estrutura adequada (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). Testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) são considerados menos exigentes e mais objetivos na detecção de *E. coli* patogênicas, como as EAEC aqui abordadas (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Devido à heterogeneidade das cepas EAEC, sabe-se que a virulência deste patotipo resulta da combinação de vários marcadores moleculares, por consequência múltiplos genes vêm sendo utilizados para o diagnóstico molecular (HUANG; JIANG; DUPONT, 2003; TOKUDA et al., 2010). Na escala plasmídial os genes *aggR* e *aatA*, presentes no plasmídeo pAA, são bastante utilizados na detecção de cepas enteroagregativas (MOON; PARK; KIM, 2005). Outros genes plasmídiais importantes como o da dispersina (*aap*) e o *astA* (*Enteraggregative heat-stable toxin*) tem perdido espaço no diagnóstico de EAEC devido a sua detecção em outros patotipos de *E. coli*, tais como, EPEC, ETEC, EHEC e em cepas não patogênicas (MENARD; DUBREUIL, 2002; MONTEIRO et al., 2009).

O gene *aggR* é altamente conservado em EAEC e têm forte correlação com o gene *aatA* (OKEKE et al., 2011). A pesquisa destes marcadores,

em estudos epidemiológicos, favorece apenas a detecção de cepas tEAEC (RUTTLE et al., 2006). Recentemente, algumas regiões cromossomais vêm sendo utilizadas para o diagnóstico de aEAEC (JENKINS et al., 2006; LIMA, I. F. et al., 2013). Dentre os genes cromossomais temos o *aaiC* e *aaiA* (DUDLEY et al., 2006; LIMA, I. F. et al., 2013). Estes genes estão presentes numa ilha de patogenicidade cromossomal inserida em *pheU*, identificada na cepa EAEC 042 (O44:H18), e estudos demonstram que esta ilha é responsável pela codificação de componentes do sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al., 2006; MORIN et al., 2013). Além disso, análises por microarranjo de DNA têm demonstrado que estes genes são bastante conservados em cepas EAEC clínicas (JENKINS et al., 2005).

2.3. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA NA ÁGUA

A água é o mais importante recurso natural do mundo e sem ela a vida não pode existir, pois nenhum processo metabólico ocorre sem a sua ação direta ou indireta. O recente crescimento e expansão demográfica e industrial observado, nas últimas décadas, trouxeram como consequência o comprometimento das águas dos rios, lagos e reservatórios, sendo estes afetados por diversos poluentes (CABRAL, 2010).

As doenças veiculadas pela água são principalmente causadas por patógenos entéricos, sendo *E. coli* de grande importância clínica, por se tratar de uma bactéria termotolerante de origem exclusivamente fecal (CABRAL, 2010). A presença de *E. coli* na água constitui uma preocupação significativa para a saúde pública, já que a transmissão de fatores de virulência entre as cepas contribui para sua patogenicidade e aumenta sua diversidade no ambiente (DONNENBERG; WHITTAM, 2001).

Estima-se que cerca de 1,8 bilhões de pessoas no mundo utilizem fontes de água expostas a contaminação fecal, sendo as fontes alternativas (poços e minas) as mais susceptíveis a este risco de contaminação (BAIN et al., 2014). Estas fontes normalmente abastecem pequenas comunidades em cidades mais remotas ou em áreas rurais. Mensura-se que uma boa parcela da população brasileira (cerca de 60%) consuma água proveniente destas fontes, aumentando assim o risco de

doenças diarreicas (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010>). Alguns trabalhos têm mostrado uma alta incidência de *E. coli* em amostras de água para consumo humano vinda das fontes alternativas (LASCOWSKI et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2003).

Embora EAEC esteja mais associada a doenças de transmissão alimentar (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012), relativamente poucos estudos têm se empenhado em determinar sua distribuição em fontes de água. Alguns deles conduzidos em diversos locais do mundo têm reportado diferentes taxas de EAEC em amostras de água (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de EAEC em amostras de água em diferentes regiões do mundo.

Tipo de água	Local	Diagnóstico	Cepas EAEC positivas	Referência
Superficial	Japão	<i>aggR</i>	1/549 (0,2%)	GOMI et al. (2015)
Consumo Humano	Líbia	Sonda CVD432	10/243 (4,1%)	ALI et al. (2012)
Água subterrânea	Argentina	<i>aggR</i> , <i>aap</i> e sonda AA	6/36 (16,7%)	LOSCH et al. (2015)
Superficial e residuária	Brasil	<i>aggR</i>	NE*	REBELLO; REGUA-MANGIA (2014)
Consumo humano	Bangladesh	<i>aaiC</i> e <i>aatA</i>	NE	TALUKDAR et al. (2013)
Superficial	África do Sul	<i>aafII</i>	NE	NONTONGANA et al. (2014)
Água superficial	Nigéria	<i>aggR</i>	7/300 (2,3%)	TITILAWO; OBI; OKOH (2015)
Água superficial	Austrália	<i>aggR</i>	87/300 (29%)	SIDHU et al. (2013)

Nota: NE: Não encontrado.

A presença de EAEC em amostras de água destinadas ao consumo ainda é pouco estudado no Brasil, ainda não há dados de sua para as infecções em humanos. Diante disso, surgiu à necessidade deste trabalho, em que foi investigada a ocorrência e características de virulência de EAEC em amostras de água destinas

ao consumo humano provindas de fontes alternativas, como poços e minas, na região norte do estado do Paraná.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. M. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 866-71, May 2012.

ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**, v. 106, p. 16-8, Nov 2014.

ARAÚJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 10, p. 3396-9, Oct 2007.

BAIN, R. et al. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. **Trop Med Int Health**, v. 19, n. 8, p. 917-27, Aug 2014.

BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian J Med Sci**, v. 62, n. 1, p. 8-12, Jan 2008.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis**, v. 161, n. 6, p. 1249-51, Jun 1990.

BEN SALEM-BEN NEJMA, I. et al. Etiology of Acute Diarrhea in Tunisian Children with Emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Identification of *E. coli* Virulence Markers. **Iran J Public Health**, v. 43, n. 7, p. 947-60, Jul 2014.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4302-11, Aug 2002.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3281-92, Jul 2008.

CABRAL, J. P. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. **Int J Environ Res Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657-703, Oct 2010.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, Mar-Apr 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4555-8, Oct 2000.

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

CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 65, n. 10, p. 4135-45, Oct 1997.

DIAS, R. C. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. **Apmis**, Jan 11 2016.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 107, n. 5, p. 539-48, Mar 2001.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1267-82, Sep 2006.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3155-63, Jul 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 281-98, Dec 2012.

FUJIYAMA, R. et al. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 474-80, May 2008.

GASSAMA-SOW, A. et al. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **J Infect Dis**, v. 189, n. 1, p. 75-8, Jan 1 2004.

GOMI, R. et al. Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* in River Water by Simultaneous Detection and Sequencing of 14 Virulence Genes. **Environ Sci Technol**, v. 49, n. 11, p. 6800-7, Jun 2 2015.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 1, p. 12-8, Jan 2006.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 3, p. 614-30, Jul 2014.

HENDERSON, I. R. et al. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5587-96, Nov 1999.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect Immun**, v. 64, n. 11, p. 4751-60, Nov 1996.

HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, n. 5, p. 506-8, Nov 2003.

HUANG, D. B. et al. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 10, p. 1386-92, Oct 2007.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 5, p. 556-63, Sep 1 2006.

JENKINS, C. et al. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 11, p. 1493-7, Nov 2006.

JENKINS, C. et al. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, n. 1, p. 119-24, Dec 1 2005.

JIANG, Z. D. et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4185-90, Nov 2002.

JONSSON, R. et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 83, n. 4, p. 1396-405, Apr 2015.

LASCOWSKI, K. M. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Parana State, Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 114, n. 4, p. 1230-9, Apr 2013.

LIMA, A. A. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr Suppl**, v. 381, p. 39-44, Sep 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. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 5, p. 683-93, May 2013.

LOSCH, L. S. et al. [Detection of virulence genes of the enteroaggregative pathotype in *Escherichia coli* strains isolated from groundwater sources in the province of Chaco, Argentina]. **Rev Argent Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 88-94, Apr-Jun 2015.

MEDINA, A. M. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 1, p. 158-63, Jul 2010.

MENARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 43-60, 2002.

MONTEIRO, B. T. et al. The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 1, p. 81-4, Sep 2009.

MOON, J. Y.; PARK, J. H.; KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, n. 2, p. 215-20, Dec 15 2005.

MORIN, N. et al. Characterization of the *AggR* regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 81, n. 1, p. 122-32, Jan 2013.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect Immun**, v. 60, n. 6, p. 2297-304, Jun 1992.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 9, p. 829-31, Sep 1987.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13-24, Jan-Feb 2011.

NISHI, J. et al. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45680-9, Nov 14 2003.

NOGUEIRA, G. et al. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 37, n. 2, p. 232-6, Apr 2003.

NONTONGANA, N. et al. Prevalence and antibiogram profiling of *Escherichia coli* pathotypes isolated from the Kat River and the Fort Beaufort abstraction water. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 8, p. 8213-27, Aug 2014.

OKEKE, I. N. et al. IS3 profiling identifies the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O-island 62 in a distinct enteroaggregative *E. coli* lineage. **Gut Pathog**, v. 3, p. 4, 2011.

OKEKE, I. N. et al. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e14093, 2010.

OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 503-5, Aug 15 2010.

OKHUYSEN, P. C. et al. Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 9, p. 1774-8, Sep 2004.

OPINTAN, J. A. et al. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 4, p. 936-43, Oct 2010.

OUNDO, J. O. et al. High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea. **J Travel Med**, v. 15, n. 1, p. 31-8, Jan-Feb 2008.

PASCHKE, C. et al. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 8, p. 1194-200, Aug 2011.

RAJENDRAN, P. et al. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 2, p. 117-22, Oct 2010.

REBELLO, R. C.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 490, p. 19-27, Aug 15 2014.

RUTTLE, M. E. et al. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, n. 2, p. 301-8, Aug 2006.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 133-9, Jan 2004.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 110, n. 9, p. 1329-37, Nov 2002.

SIDHU, J. P. et al. Occurrence of virulence genes associated with Diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 328-35, Jan 2013.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J Infect Dis**, v. 177, n. 1, p. 88-96, Jan 1998.

TALUKDAR, P. K. et al. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61090, 2013.

TITILAWO, Y.; OBI, L.; OKOH, A. Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 204, 2015.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 6, p. 320-9, Jun 2010.

VIJAY, D. et al. Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 38, p. 21-31, Feb 2015.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 687-90, Nov 2004.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **Int J Hyg Environ Health**, v. 214, n. 6, p. 417-23, Nov 2011.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de EAEC em isolados de *E. coli* obtidos de amostras de água destinadas ao consumo humano e caracterizá-los genotípicamente e fenotípicamente.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença de tEAEC e aEAEC através da detecção do padrão AA em cultura de células HEp-2 e pesquisa dos genes de diagnóstico: *aatA*, *aggR*, *aaiA* e *aaiC* pela PCR;
- Investigar a presença dos genes de virulência: *astA*, *pet*, *pic*, *aap*, *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A* e *shf* pela PCR, nas amostras EAEC;
- Analisar as propriedades fenotípicas de EAEC com relação a formação de biofilme e perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- Classificar filogeneticamente os isolados EAEC, com base no teste de Clermont, nos grupos A, B1, B2, C, D, E e F.

5. TRABALHO CIENTÍFICO

O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO À REVISTA *JOURNAL OF WATER AND HEALTH*

5.1 Identification and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* in drinking water supplies of North Paraná State, Brazil

EAEC in drinking water supplies

Paulo Alfonso Schüroff¹, Nicole Ribeiro de Lima¹, Tatiane das Neves Burgos¹, Angélica Marim Lopes-Dambrozio¹, Guilherme Biz², Sérgio Paulo Dejato da Rocha¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi¹, Gerson Nakazato¹, Eliana Carolina Vespero³, Jacinta Sanchez Pelayo^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil;

²Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil;

³Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 86039-440, Londrina, Paraná, Brasil;

* corresponding author: E-mail: jspelayo@gmail.com; Tel.: +55-43-3371-4494

Abstract: The present work aimed to investigate and characterize enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) pathotype in 750 *E. coli* isolates from 250 samples of drinking water untreated collected from 21 municipalities in north of Paraná State between January 2012 and December 2014. In the adhesion test 84% of the isolates were classified as EAEC for presenting the aggregative adherence (AA) pattern in HEp-2 cells. Of the four diagnostic genes researched *aatA*, *aggR*, *aaiA* and *aaiC*, only *aaiC* was found in 7.2% isolates. In the biofilm formation test 72.4% isolates presented biofilm formation and of these 95.6% belonged to EAEC pathotype. The 18 *aaiC* positive isolates were tested for eight virulence genes associated with EAEC, antimicrobial resistance and phylogenetic analysis. Only the virulence genes *astA* (72.2%), *shf* (22.2%) and *pic* (5.6%) were detected. Resistance was verified only for the antibiotics ampicillin (38.9%) and cephalothin (11.1%). In phylogenetic analysis the phylogroups B1 (61.1%) and A (22.2%) were the most prevalent. The results found show that drinking water is an important reservoir for EAEC in environment. Thus the investigation and monitoring of drinking water sources may be useful to prevent waterborne outbreaks.

Keywords: EAEC, *Escherichia coli*, drinking water

1. Introduction

Waterborne diseases are a major public health problem, where the lack of drinking water sources and basic sanitation are responsible for 88% of deaths caused by diarrheal disease worldwide. Overall, 99% of these deaths are in developing countries and around 84% of them occur in children (WHO 2009).

Escherichia coli bacteria have been widely distributed in drinking water samples. It is estimated that about 1.8 billion people in the world use water sources contaminated by *E. coli* and are thus exposed to diarrhea diseases (Bain *et al.* 2014). Among the main diarrheagenic *E. coli* pathotypes stands out the enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC).

EAEC has been considered an emergent pathogen and is responsible for cases of acute and chronic diarrhea in developing and industrialized countries. Many virulence factors are important in the pathogenesis of infection by EAEC, including aggregative adherence fimbriae (AAF), with their four distinct variants (AAF I-IV), anti-aggregation protein (dispersin), EAEC heat-stable toxin 1 (EAST1), plasmid-encoded toxin (Pet), protein involved in colonization (Pic) and homologue of *Shigella flexneri* (Shf) (Czeczulin *et al.* 1999; Boisen *et al.* 2012).

The gold standard for EAEC identification remains the presence of aggregative adherence (AA) in HEp-2 cell assay. This methodology presents several limitations for clinical diagnosis and epidemiological studies, because it is expensive, labor intensive and requiring adequate infrastructure and qualified personnel (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia 2012). As an alternative to this method, several molecular markers have been used as plasmid-borne genes *aggR* (aggregative adherence regulator) and *aatA* (anti-aggregation protein transporter) and chromosomal genes *aaiC* and *aaiA*. Considering the importance of the *aggR* gene as regulator of the expression of other virulence factors, EAEC pathotype became divided into two groups: typical EAEC (tEAEC) and atypical EAEC (aEAEC) based on the presence or absence of *aggR* gene, respectively (Schmidt *et al.* 1995; Dudley *et al.* 2006).

Although it is commonly found in HIV positive patients (Medina *et al.* 2010), children (Lima *et al.* 2013), travelers (Mohamed *et al.* 2007) and in foodborne outbreaks (Estrada-Garcia & Navarro-Garcia 2012), EAEC has been little researched in drinking water supplies. Thus investigation of EAEC occurrence in water is of great

epidemiological importance because it may serve as a contamination vehicle for humans and animals.

Therefore, the objective of the present study was to investigate the presence of tEAEC and aEAEC in drinking water sample by molecular markers and adhesion test in HEp-2 cells. The isolates were characterized based on their virulence profiles, biofilm formation, antimicrobials resistance and phylogenetic analysis.

2. Materials and methods

2.1 *Escherichia coli* sampling, isolation and identification

The study was carried out in 21 municipalities located in the Northern region of the state of Paraná, Brazil. Samples of drinking water were collected from alternative supplies such as artesian and shallow wells and springs, that did not have any type of treatment. A total of 250 samples were obtained from January 2012 to December 2014.

E. coli was detected by the Colilert chromogenic substrate technique (SOVEREIGN, São Paulo, SP, BR). Aliquots were removed from the water samples positive for *E. coli* in the Colilert chromogenic kit and sub-cultured in MacConkey agar (Difco, Sparks, MD, USA) at 37°C for 24 hours. Three colonies were randomly selected from each MacConkey plate and then identified biochemically using the kit EPM, Milli and Simmons' Citrate Agar (PROBAC, São Paulo, SP, BR). A total of 750 isolates (three from each sample) was identified as *E. coli* and stored in Brain-Heart Infusion broth (BHI) (Difco) with 20% glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA) at -80°C.

2.2 Adhesion test

All 750 *E. coli* isolates were tested for adherence to HEp-2 cells as described by Cravioto *et al.* (1979). The adherence pattern was defined in 6 h of incubation at 37°C.

2.3 Bacterial DNA Extraction

To extract the DNA, the *E. coli* isolates were grown in Luria-Bertani broth (LB) (Difco) for 18 hours at 37°C; 1.5 mL of the culture were added to microcentrifuge tubes at 10 000 x g for 10 minutes. The bacterial precipitate was re-suspended in 200 µL sterile ultrapure water, boiled for 10 minutes, and then centrifuged at 10 000 x g for 5 minutes and the supernatant used in the PCR reactions.

2.4 Detecting the diagnostic genes by PCR

All 750 *E. coli* isolates were submitted for the detection of plasmidial genes (*aatA*, *aggR*) and the chromosome genes (*aaiA*, *aaiC*) by PCR. The PCR reaction was performed at a thermocycler Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In observation of the amplified product was used electrophoresis in 1.5% agarose gel (Invitrogen), stained with SYBR Safe™ DNA Gel Stain solution (Invitrogen) and observed in an Ultra-Violeta (UV) trans-illuminator. A 100-pb DNA ladder (Invitrogen) was loaded on each gel. The EAEC 042 (O44:H18) was used as positive control of reactions. HB101 (*E. coli* K-12) and water were the negative controls. The PCR conditions, primer sequences and size of products obtained are listed in Table 1.

Table 1 - Primer sequence, size of products obtained and annealing temperature for the diagnostic, virulence and phylogenetic genes used.

Gene	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (pb)	Annealing temp. (°C)	References
Diagnostic genes				
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	57 °C	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
<i>aggR</i>	(F) GCAATCAGATTAARCAGCGATACA (R) CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	426	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	56 °C	Dudley <i>et al.</i> (2006)
<i>aaiC</i>	(F) ATTGTCCTCAGGCATTTACACG (R) ACACCCCTGATAAACAA	215	57 °C	Lima <i>et al.</i> (2013)
Virulence genes				
<i>shf</i>	(F)ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATT C (R)ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTC	613	51 °C	Czczulin <i>et al.</i> (1999)

	AT			
<i>astA</i>	(F) ATGCCATCAACACAGTATAT (R) GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	110	58 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>pet</i>	(F) GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT (R) CCTCTTGTTTCCACGACATAC	302	58 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>pic</i>	(F) ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT (R) GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG	572	58 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>aap</i>	(F) GGACCCGTCCCAATGTATAA (R) CCATTCGGTTAGAGCACGAT	250	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>aggA</i>	(F) TCTATCTRGGGGGGCTAACGCT (R) ACCTGTTCCCCATAACCAGACC	220	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>aafA</i>	(F) CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGCTA (R) GGAGAGGCCAGAGTGAATCCTG	289	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>agg3A</i>	(F) CCAGTTATTACAGGGTAACAAGGGAA (R) TTGGTCTGGAATAACAACCTTGAACG	370	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
<i>agg4A</i>	(F) TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA (R) CACCATAAGCCGCCAATAAAGC	169	57 °C	Boisen <i>et al.</i> (2012)
Phylogenetic				
<i>arpA</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	59 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
<i>chuA</i>	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	59 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
<i>yjaA</i>	(F) CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	59 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
TspE	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	59 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
4.C2	(R) AGTTTATCGCTGCGGGTCCG			

2.5 Biofilm formation test

One isolate from each water sample was submitted to biofilm formation test following the method described by Wakimoto *et al.* (2004), biofilm formation was considered when the optical density (OD) at 570 nm presented a value above 0.2. The EAEC 042 strain (O44:H18) was used as positive control and HB101 (*E. coli* K-12) as negative control.

2.6 Determination of susceptibility to antimicrobials

From each water sample one *E. coli* isolate that presented some diagnostic gene was submitted to antimicrobial susceptibility test as described by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). The following antimicrobial agents (Oxoid, Basingstoke, UK) were used: nalidixic acid (30 µg), amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), cefoxitin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), ampicillin-sulbactam (10/10 µg) and trimethoprim- sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg).

2.7 Research of virulence genes by PCR

The same *E. coli* isolates that were tested for susceptibility to antimicrobials was screened by PCR for the presence following virulence genes: Shf (*shf*), EAST1 (*astA*), Pet (*pet*), Pic (*pic*), dispersin (*aap*) and the four fimbriae (AAF I-IV) represented, respectively, by the genes *aggA*, *aafA*, *agg3A* and *agg4A*. The PCR conditions, primer sequences and size of products obtained are listed in Table 1. The EAEC 042 (O44:H18) strain was used as positive control of the genes *shf*, *astA*, *pet*, *pic*, *aap* and *aafA*; EAEC 17-2 (O3:H2) for the *aggA* gene; EAEC 55989 for the *agg3A* gene and EAEC C1010-00 for the *agg4A* gene. HB101 (*E. coli* K-12) and water were the negative controls.

2.8 Distribution of the phylogenetic groups

Positive isolates for diagnostic genes were also tested for phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E and F) by the PCR technique according to the study by Clermont *et al.* (2013), using the quadraplex with the DNA markers *arpA*, *chuA*, *yjaA* and the DNA fragment TspE4.C2 (Table 1).

2.9 Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the chi-square (X^2) test and the exact Fisher test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The R statistical program (Federal University of Paraná, Curitiba, PR, BR) was used for the analyses.

3. Results

3.1 EAEC identification

All the 750 *E. coli* isolates from different drinking water sources were tested for the presence of AA pattern and diagnostic genes *aatA*, *aggR*, *aaiC* and *aaiA*.

In the adhesion test in HEp-2 cells, only one *E. coli* adhesion pattern was associated with each water sample. The frequency of the distinct adherence patterns found was 210 (84%) presenting the AA pattern, four (1.6%) the diffuse adherence, 26 (10.4%) undefined adherence and 10 (4%) did not adhere to HEp-2 cells. Therefore 84% of bacterial isolates were classified as EAEC and the AA pattern was significantly predominant in the water samples analyzed ($p < 0.05$).

Of the four diagnostic genes researched, *aaiC* gene showed to be present in 18 (7.2%) samples. The other three genes (*aaiA*, *aataA* and *aggR*) were not found. All the isolates positive to *aaiC* gene also expressed the aggregative phenotype in the adhesion test. The non-detection of *aggR* gene classified all the EAEC isolates as aEAEC.

The results obtained by molecular diagnosis compared with the adhesion test, showed that EAEC detection by the phenotypic test (210/250, 84%) was significantly greater than that by molecular diagnosis (18/250, 7.2%) ($p < 0.05$). Comparing these results, it is possible to conclude that the PCR technique, using molecular diagnostic genes, did not diagnose 91.4% of EAEC found by the adhesion test.

3.2 Biofilm formation

In the biofilm formation test the 250 isolates analyzed were classified in two groups based on their absorbance values: group 1 ($OD_{570} > 0.2$) with 159 isolates and group 2 ($OD_{570} \leq 0.2$) with 91 isolates. The proportion of aEAEC isolates was significantly greater in group 1 than in group 2 ($p < 0.05$). In the research of the *aaiC* gene, only one of the 18 positive isolates did not form biofilm ($OD_{570} \leq 0.2$) (Table 2).

Table 2 - aEAEC and *aaiC* gene presence in each absorbance group.

Group	OD_{570}	Nº isolates	<i>aaiC</i> (%)	aEAEC (%)
1	$> 0,2$	159	17 (10,7)	152 (95,6) ¹
2	$\leq 0,2$	91	1 (1,1)	58 (63,7)
Total		250	18 (7,2)	210 (84)

Notes: OD_{570} , optical density at 570 nm; aEAEC, atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. ¹ $p < 0.05$.

3.3 Susceptibility to antimicrobials

Eleven (61.1%) of 18 bacterial isolates researched did not show any resistance to the antibiotics tested, while seven (38.9%) were resistant to at least one antimicrobial (Table 3). Two of seven isolates (L59/12 and L586/14) were resistant simultaneously to two antimicrobials (ampicillin and cephalothin). Resistance was identified for ampicillin (5/18, 38.9%) and cephalothin (2/18, 11.1%). There was no significant difference between the resistance rates of two antimicrobials ($p = 0.121$).

Table 3 - Genotypic and phenotypic characteristics of the *E. coli* isolates positives for *aaiC* gene and AA pattern obtained from drinking water supplies.

Isolate	Year	Source	Virulence genes ¹	Resistance profile ²	Biofilm formation	Phylogenetic group
L59/12	2012	SW	-	AMP ³ /KF ³	+	B1
L110/12	2012	SW	<i>astA</i>	Susceptible	+	B1
L206/12	2012	SW	-	Susceptible	+	B1
L265/12	2012	SW	-	Susceptible	+	A
L79/13	2013	SW	<i>astA</i>	Susceptible	+	A
L160/13	2013	AW	<i>astA</i>	Susceptible	+	A
L165/13	2013	SP	<i>astA</i>	Susceptible	+	B1
L200/13	2013	SW	-	Susceptible	-	A
L205/13	2013	SP	<i>astA</i>	AMP ³	+	B1
L227/13	2013	SP	<i>astA shf</i>	Susceptible	+	B2
L243/13	2013	SP	<i>astA</i>	AMP ³	+	B1
L305/13	2013	SW	-	AMP ³	+	B1
L411/13	2013	SP	<i>astA</i>	Susceptible	+	B1
L255/14	2014	SP	<i>astA</i>	AMP	+	B1
L554/14	2014	SP	<i>astA pic</i>	AMP ³	+	B1
L586/14	2014	SP	<i>astA shf</i>	AMP ³ /KF ³	+	B1
L617/14	2014	SP	<i>astA shf</i>	Susceptible	+	E
L668/14	2014	SW	<i>astA shf</i>	Susceptible	+	B2

Notes: SW, shallow well; AW, artesian well; SP, spring; AMP, ampicillin; KF, cephalothin; AA, aggregative adhesion.

¹Virulence genes researched: *shf*, *astA*, *pet*, *pic*, *aap*, *aggA*, *aafA*, *agg3A* and *agg4A*.

²Antimicrobial agents used: nalidixic acid, amikacin, ampicillin, cephalothin, cefoxitin, ciprofloxacin, gentamicin, piperacillin-tazobactam, ampicillin-sulbactam and trimethoprim-sulfamethoxazole.

³Resistance to determined drug is intermediary according to the CLSI.

3.4 Virulence genes

Only three of eight virulence genes researched were present in 18 *E. coli* isolates analyzed. The *astA* gene was found in 13 (72.2%), *shf* was found in four

(22.2%) and the *pic* gene in one (5.6%) isolate. The four isolates positive to *shf* gene and the isolate positive for *pic* gene also presented *astA* gene, as shown in Table 3.

3.5 Phylogenetic classification

Phylogenetic analysis revealed that the majority of the 18 isolates analyzed belonged to the B1 phylogroup (11/18, 61.1%), followed by groups A (4/18, 22.2%), B2 (2/18, 11.1%) and E (1/18, 5.6%) (Table 3). The proportion of the isolates belonging to B1 and A groups was significantly greater than those from other groups ($p < 0,05$).

4. Discussion

EAEC pathotype has been little reported in drinking water sources (Carlos *et al.* 2011), as well as only one diarrhea outbreak was described in the literature associating EAEC strains with drinking water (Pai *et al.* 1997). Thus EAEC is considered a neglected pathogen, the absence of studies of this pathotype difficulty to know their real distribution worldwide. In Brazil this present study, to our knowledge, is the first report of the presence of EAEC in drinking water samples.

Initially EAEC isolates were submitted to the adhesion test in HEp-2 cells, in which was detected a large occurrence of this pathotype (84%). The AA pattern presence and no detection of the regulatory gene (*aggR*) classified all samples as aEAEC. High incidence of aEAEC has been reported in stool samples from children and animals (Vijay *et al.* 2015). The high presence of bacterial strains presenting the AA pattern was also described in other *E. coli* isolates obtained from drinking water samples (Lascowski *et al.* 2013). This work believes that the presence of this phenotype is extremely useful in the environment, enabling the bacterial colonization of piping and water reservoirs.

Various plasmidial and chromosome genes have been used to diagnose EAEC by PCR, but none of them has been shown to be widely distributed (Bouzari *et al.* 2005; Lima *et al.* 2013). Recently, Andrade *et al.* (2014) developed a multiplex PCR that could be useful in detecting aEAEC strains. The diagnostic genes *aaiA*, *aaiG*, *aggR* and *aatA* were used and it was found that the molecular method detected 85% of the aEAEC identified initially by the adhesion test. In the present

study, the use of molecular markers *aaiA*, *aaiC*, *aggR* and *aatA* was able to detecting only 8.6% (18/210) of aEAEC identified in adhesion test. The data of this work are divergent to that observed by Andrade *et al.* (2014) and reinforce the hypothesis of the search for new markers to detect aEAEC strains.

Biofilm formation by EAEC is an important factor that contributes to the persistence of bacterial infection, allowing the bacterial evasion of local immune system in addition to making the microorganism more resistant to antimicrobial agents (Mohamed *et al.* 2007). The high number of biofilm forming isolates may be related to their aquatic origin, because it naturally tends to form a more intense biofilm in order to facilitate their permanence and survival in the environment. Overall, the proportion of biofilm forming EAEC strains varies greatly in literature, Vijay *et al.* (2015) reported that 73% of strains isolated from human stool samples and 35% of those from animal stool were shown to be biofilm formers. In another study, 47% of the isolates of human origin did not form biofilm (Mohamed *et al.* 2007). These different results indicated that the variation in biofilm formation may be due to geographic region where EAEC strains were isolated, their origin, or genetic heterogeneity of the strains.

Antimicrobial resistance has been an important test for characterizing EAEC. Some studies have reported that the presence of antibiotic resistant of *E. coli* strains varies according to geographic region, strain origin and pathotype researched (Rebello & Regua-Mangia 2014). According to the literature, indiscriminate use of first-generation penicillin (ampicillin) and first-generation cephalosporin (cephalothin) in recent decades has led to a greater rate of strains resistant to these antimicrobials compared to more recent drugs, such as the group of quinolones and fluoroquinolones (Medina *et al.* 2010).

Of the eight virulence genes screened, *astA* was the most prevalent (Table 3). This gene is responsible for encode the EAEC heat-stable toxin 1 (EAST1) and several studies have reported a high proportion of strains possessing *astA* gene in aquatic environments (Sidhu *et al.* 2013; Rebello & Regua-Mangia, 2014). It should be pointed out that EAEC strains (*astA* positive) have already been described as responsible for a large outbreak of diarrhea that occurred in 16 high schools in Japan, affecting about 2.697 children in 1997 (Itoh *et al.* 1997). In general, EAEC strains are considered fairly heterogeneous presenting a variety of virulence factors. It is believed that this heterogeneity may be the result of acquisition and deletion of

genetic elements. The location of many genes in plasmids, transposons and pathogenicity islands contributes to this genetic loss or gain (Okeke *et al.* 2010).

E. coli strains are separated into seven main phylogenetic groups: A, B1, B2, C, D, E and F (Clermont *et al.* 2013). The isolates analyzed in this work were classified mainly on the phylogenetic groups B1 and A (Table 3). The wide distribution of these phylogenetic groups has also been reported in EAEC obtained from food products and stool samples in other regions of the world (Rúgeles *et al.* 2010). Although EAEC strains are considered phylogenetically diverse, some specific phylogenetic groups may predominate according to geographic region researched or virulence profile found (Okeke *et al.* 2010).

5. Conclusions

In summary, this work is the first to describe EAEC pathotype from drinking water supplies in Brazil, thus the results suggest that drinking water is an important reservoir for EAEC. Although the adhesion test on epithelial cells is still of great importance in identifying this pathotype, the research of new molecular markers to detect EAEC is necessary. In addition, the presence of different virulence profiles and phenotypic characteristics in EAEC strain is of great concern for public health, mainly because these strains may be transmitted directly to humans, animals and foods.

Acknowledgments

The authors thank the Virology Laboratory (UEL) for supplying the HEp-2 cell cultures, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação Araucária for financial support.

References

- Andrade, F. B., Gomes, T. A. T. & Elias, W. P. 2014 A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods.* **106**, 16–18. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.030>
- Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., Prüss-Ustün, A. & Bartram, J. 2014 Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Trop. Med. Int. Health.* **19**, 917–927. <http://doi.org/10.1111/tmi.12334>
- 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. *J. Infect. Dis.* **205**, 431–444. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir757>
- Bouzari, S., Jafari, A. & Zarepour, M. 2005 Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. *Infect. Genet. Evol.* **5**, 79–83. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.06.005>
- Carlos, C., Alexandrino, F., Vieira, M. A. M., Stoppe, N. C., Sato, M. I. Z., Gomes, T. A. T. & Ottoboni, L. M. M. 2011 Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from healthy animals and water sources in Brazil. *J. Water Health.* **9**, 138–142. <http://doi.org/10.2166/wh.2010.068>
- 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. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 58–65. <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) 2012 11th edn, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard, M02-A11. Wayne, PA, USA.
- 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. *Curr. Microbiol.* **3**, 95–99. <http://doi.org/10.1007/BF02602439>
- Czeczulin, J. R., Whittam, T. S., Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. 1999 Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**, 2692–2699.

- 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*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1267–1282. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x>
- Estrada-Garcia, T. & Navarro-Garcia, F. 2012 Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **66**, 281–298. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x>
- Itoh, Y., Nagano, I. & Kunishima, M. 1997 Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2546–2550.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1230–1239. <http://doi.org/10.1111/jam.12113>
- Lima, I. F. N., Boisen, N., Da Silva Quetz, J., Havt, A., De Carvalho, E. B., Soares, A. M., Lima, N. L., Mota, R. M., Nataro, J. P., Guerrant, R. L. & Lima, A. A. 2013 Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J. Med. Microbiol.* **62**, 683–693. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.054262-0>
- Medina, A. M., Rivera, F. P., Romero, L. M., Kolevic, L. A., Castillo, M. E., Verne, E., Hernandez, R., Mayor, Y. E., Barletta, F., Mercado, E. & Ochoa, T. J. 2010 Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 158–63. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0596>
- Mohamed, J. A., Huang, D. B., Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Nataro, J. P., Belkind-Gerson, J. & Okhuysen, P. C. 2007 Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 121–126. <http://doi.org/10.1128/JCM.01128-06>
- Okeke, I. N., Wallace-Gadsden, F., Simons, H. R., Matthews, N., Labar, A. S., Hwang, J. & Wain, J. 2010 Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *PLoS One.* **5**, e14093. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014093>
- Pai, M., Kang, G., Ramakrishna, B. S., Venkataraman, A. & Mulyil, J. 1997 An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Indian. J. Med. Res.* **106**, 7–12.
- Rebello, R. C. de L. & Regua-Mangia, A. H. 2014 Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total. Environ.* **490**, 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.040>

- Rúgeles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C. & Gómez-Duarte, O. G. 2010 Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 282–296. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.034>
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J. & Karch, H. 1995 Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 701–705.
- Sidhu, J. P. S., Ahmed, W., Hodgers, L. & Toze, S. 2013 Occurrence of virulence genes associated with Diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 328–335. <http://doi.org/10.1128/AEM.02888-12>
- Vijay, D., Dhaka, P., Vergis, J., Negi, M., Mohan, V., Kumar, M., Malik, S. S., Barbuddhe, S. B. & Rawool, D. B. 2015 Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 21–31. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.11.004>
- 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*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 687–690.
- WHO (World Health Organization) 2009 Global Health Risks, Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf (accessed 24 November 2015).

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a água é um importante reservatório para EAEC e que o teste de adesão em células epiteliais ainda é de grande importância na identificação deste patótipo. A pesquisa de novos marcadores moleculares para a detecção de EAEC é necessária, uma vez que os genes de diagnóstico conhecidos ainda não conseguem diagnosticar todas as cepas de *E. coli* possuidoras do padrão AA. A presença de diferentes perfis de virulências e características fenotípicas nas cepas EAEC é de grande preocupação para a saúde pública, principalmente devido à possibilidade destas cepas serem transmitidas diretamente para homens e animais ou ainda contaminar alimentos.