



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

KAWANA HIROMORI MACEDO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO EM UM
ASSENTAMENTO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

Londrina
2018

KAWANA HIROMORI MACEDO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO EM UM
ASSENTAMENTO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

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

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

Londrina
2018

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

Macedo, Kawana Hiromori .

Caracterização de Escherichia coli diarreio gênica isoladas de água para consumo humano em um assentamento na região norte do paraná / Kawana Hiromori Macedo. - Londrina, 2018.
54 f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertao (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduao em Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Escherichia coli diarreio gênica - Tese. 2. Qualidade da gua - Tese. 3. Assentamento - Tese. 4. Diarreia - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduao em Microbiologia. III. Título.

KAWANA HIROMORI MACEDO

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
ISOLADAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO EM UM
ASSENTAMENTO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 23 de março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais Justino e Cristiane, por me proporcionarem todo suporte necessário para vencer essa etapa da minha vida. Ao meu namorado David, por todo apoio e incentivo nessa caminhada, e aos meus irmãos, Lucas e Rafaela, por todo carinho e amor durante todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda fé, força e sabedoria, e por me fortalecer durante todo esse tempo permitindo alcançar meus objetivos.

À minha família por todos os valores que me ensinaram, por todo o suporte que me deram, pela compreensão, e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao meu namorado, David, por me encorajar e incentivar a todo momento, e me dar o apoio necessário para conseguir vencer essa etapa.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, pelo auxílio, paciência e dedicação e, principalmente, pelo ensinamento e amizade durante esses anos.

Aos meus amigos, Caroline, Angélica e Matheus, por toda ajuda para realização dos meus experimentos, pelo companherismo, por horas extras no laboratório, por todas as dúvidas que foram esclarecidas e por cada momento de alegria, que sem vocês não seria possível.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha e aos meus colegas de laboratório, Anahí, Gustavo, Wellington, Willian e Thamires, por me ajudar na elaboração do meu projeto e pelos momentos de entusiasmo partilhados.

À nossa querida técnica do laboratório, Claci, pela paciência e ajuda em cada momento.

Às colegas do Laboratório de Virologia da UEL, em especial, Karoline Fontana e Daniele Rechenchoski, pelo fornecimento do cultivo de células para a realização do trabalho.

Muito obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

MACEDO, Kawana Hiromori. **Caracterização de *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de água para consumo humano em um assentamento na Região Norte do Paraná.** 2018. 52 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, 2018.

RESUMO

Doenças transmitidas pela água são originadas em sua maioria por contato com patógenos entéricos, sendo o grupo das *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC) um importante agente de infecções gastrointestinais em adultos e crianças. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de 58 amostras de água *in natura* para consumo, coletadas de poços rasos e minas em um assentamento rural na região sul do Brasil. Os isolados de *E. coli* foram caracterizados genotipicamente dentro dos patótipos de DEC, pela investigação de genes de virulência (*eae*, *bpfA*, *stx1*, *stx2*, *Lt*, *St-Ia*, *St-Ib*, *ipaH*, *aaiA*, *aaiC*, *aatA* e *aggR*), pela técnica da PCR e caracterizados fenotipicamente quanto a formação de biofilme e adesão em células HEp-2. Todas as amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e 36 (62,1%) por *E. coli*. Foram identificadas DEC em 6,89% das amostras de água que apresentaram *E. coli*: três (5,17%) ETEC e uma (1,72%) EAEC. Em células HEp-2, EAEC apresentou adesão agregativa e as três cepas de ETEC apresentaram diferentes padrões de adesão: adesão difusa, adesão agregativa e adesão não definida. Todas as DEC foram formadoras de biofilme. Dois isolados de ETEC apresentaram resistência a ampicilina e tetraciclina, uma ETEC, a aminoglicosídeos. EAEC foi sensível a todos os antibióticos testados. De acordo com a filogenia, todas as ETEC foram classificadas no filogrupo B1 e a EAEC no filogrupo E. Os sorotipos encontrados em nosso estudo foram: EAEC O24:H21e ETEC OR:H21, O17:H46 e O6:H12. As análises físico-químicas mostraram que todas as amostras estavam dentro dos parâmetros normais de flúor e 13 (22,4%) apresentaram resultados acima do padrão permitido de turbidez. A presença de *E. coli* e DEC nas amostras de água analisadas indica a necessidade de adoção de medidas que evitem a contaminação da água fornecida à população do assentamento rural analisado, evitando assim, a transmissão de doenças.

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreio gênica. Qualidade da água. Assentamento.

MACEDO, Kawana Hiromori. **Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from water for human consumption in a settlement in the Northern Region of Paraná.** 2018. 52 p. Master's Degree Dissertation (Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Water-borne diseases are mostly caused by contamination with enteric pathogens, and bacteria in the diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) group are important agents of gastrointestinal disease in adults and children. The aim of this study was to evaluate the microbiological and physicochemical quality of 58 *in natura* water samples collected from shallow wells and mines in a rural settlement in southern Brazil. *E. coli* isolates were characterized genotypically according to DEC pathotypes by investigating virulence genes (*ea*e, *bpfA*, *stx1*, *stx2*, *Lt*, *St-Ib*, *St-Ib*, *ipaH*, *aaiA*, *aaiC*, *aatA*, and *aggR*) by PCR. Antibiotic resistance, biofilm formation, and adherence in HEp-2 cells were also characterized. All water samples presented contamination with total coliforms, and 36 (62.1%) with *E. coli*. DEC was identified in 6.89% of the water samples with *E. coli*: three (5.17%) with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and one (1.72%) with enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Regarding adherence patterns, EAEC showed aggregative adherence, whereas various ETEC strains presented diffuse, aggregative, and non-defined adherence. All DEC strains were biofilm forming. Concerning antibiotic resistance, two isolates of ETEC showed resistance to ampicillin and tetracycline, and one isolate showed resistance to aminoglycosides. The EAEC isolate was sensitive to all antibiotics tested. Based on the phylogeny, all ETEC isolates were classified into phylogenetic group B1, whereas the EAEC isolated clustered with the E phylogenetic group. The serotypes identified in our study were EAEC O24:H21 and ETEC: ONT:H21, O17:H46, and O6:H12. The physical-chemical analysis showed that all water samples were within normal fluorine parameters; however, measured turbidity was above the permitted standard in 13 (22.4%) samples. The presence of *E. coli* and DEC in water samples indicates the need to take action to prevent contamination of water resources accessed by people in this rural settlement to prevent the transmission of diseases.

Keywords: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Water quality. Rural settlement

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 10 |
| 2.1 | ABASTECIMENTO DE ÁGUA EM ASSENTAMENTO RURAL..... | 10 |
| 2.2 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 12 |
| 2.3 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)..... | 13 |
| 2.4 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) E <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) | 15 |
| 2.5 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)..... | 17 |
| 2.6 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC) | 18 |
| 2.7 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROINVASORA (EIEC)..... | 20 |
| 2.8 | PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... | 22 |
| 2.8.1 | Turbidez..... | 22 |
| 2.8.2 | Fluoreto..... | 22 |
| 3 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 23 |
| 4 | OBJETIVOS | 33 |
| 4.1 | OBJETIVOS GERAIS..... | 33 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 5 | TRABALHO CIENTFICO | 34 |
| 6 | CONCLUSÃO | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A água é considerada o recurso natural mais importante do mundo, sendo destinada aos mais diversos fins, porém a sua qualidade se encontra cada vez mais precária, tornando um bem escasso. As condições inadequadas de saneamento, sobretudo nas áreas rurais, associadas à falta de conhecimento da população, aumentam a prevalência de doenças transmitidas pela água.

Em locais como os assentamentos, localizados em áreas rurais, onde há falta de uma infraestrutura adequada e uma condição higiênico-sanitária baixa, é comum não ter abastecimento de água público. Isso ocorre, devido à distância da região urbana, assim como o alto custo para a instalação de um sistema de abastecimento no local. Portanto, os assentados procuram soluções alternativas para resolver o problema, abastecendo-se mediante águas provenientes de fontes subterrâneas, como poços rasos e minas, que em sua maioria, estão sujeitas a contaminação.

O método mais efetivo para manter a qualidade da água para consumo consiste em formas de proteção das fontes, evitando-se contaminações por dejetos de animais e humanos, e principalmente o tratamento da água. Falhas na proteção e no tratamento expõem a comunidade a riscos de doenças intestinais e a outras doenças infecciosas.

A água pode atuar como veículo de diversos agentes patogênicos, entre eles, bactérias, vírus e protozoários. No entanto, os principais microrganismos transmitidos por meio de águas contaminadas são de origem entérica, sendo assim, um dos maiores focos de contaminação em águas subterrâneas é o contato com fezes de animais e humanos.

A água contaminada pode causar grandes surtos de gastroenterites, sendo considerada uma importante causa de mortalidade em todo o mundo. Um dos grupos de microrganismos envolvidos em doenças de veiculação hídrica é o da *Escherichia coli* diarréiogênica (DEC). Em vista disso, observamos a importância de investigar a prevalência de DEC em cepas de *E. coli*, isoladas de amostras de água de um assentamento localizado na região norte do Paraná, com intuito de evitar a disseminação desses patógenos e propagação de doenças nesse local.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 ABASTECIMENTO DE ÁGUA EM ASSENTAMENTO RURAL

A Política Social no contexto rural foi aplicada perante as lutas dos movimentos sociais. No atual sistema brasileiro de reforma agrária, o termo assentamento rural se refere a novas propriedades onde serão instaladas famílias com a intenção de explorar a área agrícola, beneficiando o desenvolvimento socioeconômico (SOUSA, 2013; BARROS, 2013).

O custo financeiro e a complexidade para a implantação do saneamento básico nas áreas rurais são altos. Em vista disso, é necessário criar soluções alternativas adaptáveis a esses locais, atendendo as suas necessidades (BARROS, 2013; FUNASA, 2014). Assim, as principais fontes de abastecimento de água no meio rural são de origem subterrânea, como poços rasos, nascentes e minas – fontes sujeitas a contaminação devido às baixas profundidade e proximidade com a superfície do solo, estando exposta ao escoamento de águas da chuva que carregam impurezas (AMARAL et al., 2003; ARAÚJO et al., 2011).

A contaminação da água pode ocorrer devido à falta de proteção e conservação de suas fontes, armazenamento inadequado, pela presença de animais próximos as estruturas de captação de água, lançamentos de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado (BARROS, 2013). A água, quando não tratada e exposta a agentes contaminantes, é capaz de ocasionar grandes surtos, como um surto de gastroenterite causado pelo consumo de água contaminada em uma cidade na Finlândia, provocado por uma conexão cruzada inadequada entre águas residuais e água potável, que acometeu estimadamente 8.453 moradores, no qual o patógeno mais encontrado foi *Campylobacter* sp., seguida por *Giardia*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *rotavírus* e *Shigella boydii* (LAINE et al., 2011).

A água para consumo humano é considerada um importante transmissor de doenças de natureza infecciosa, sendo ocasionadas principalmente pela presença de microrganismos patogênicos de origem entérica, através da contaminação com fezes humanas ou de animais (CABRAL, 2010).

Os animais podem transportar uma ampla gama de agentes patogênicos que são capazes de provocar doenças gastrointestinais em humanos, podendo ser excretados pelas fezes. Entre eles, incluem as bactérias *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., Enterococos e *Escherichia coli*, os protozoários *Giardia* spp.,

Cryptosporidium spp., e os vírus entéricos, como adenovírus e enterovírus (CURTIS; CAIRNCROSS; YONLI, 2000; COX et al., 2005; TAVARES et al., 2005).

Estima-se que a falta de higiene, saneamento básico e consumo de água inadequada, podem causar 842 mil mortes por diarreia anualmente. Isso representa 58% de todas as mortes provocadas por diarreia e equivale a 1,5% do total de doenças em todo o mundo (PRÜSS-USTÜN et al., 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017), todos os anos, 361 mil crianças com menos de cinco anos, no mundo, morrem devido à diarreia ocasionada pela falta de saneamento básico e água contaminada.

As bactérias do grupo coliformes pertencem a uma família de bactérias denominada *Enterobacteriaceae*, composta por quatro gêneros, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Entre elas, *E. coli* esta relacionada com a transmissão de doenças de veiculação hídrica, sendo frequentemente utilizada para a avaliar a qualidade microbiológica da água, por se tratar de uma bactéria termotolerante de origem exclusivamente fecal e possuir uma grande importância clínica, (CABRAL, 2010; DUNN et al., 2014).

Rheinheimer et al. (2010) analisaram amostras de água de 35 poços rasos, durante diferentes estações do ano, e os coliformes totais estavam presentes em todas as fontes, independente da época das coletas. Da mesma forma, estudos realizados na cidade de Londrina-PR com amostras de água de 168 poços rasos, no período de 2005-2010, constataram que 142 amostras (84,5%) estavam contaminadas com coliformes totais e 93 amostras (55,4%) com *E. coli* (BURGOS et al., 2014). Em contrapartida, um estudo realizado com 214 amostras de água coletadas de 107 Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) das cidades de Londrina, Cambé, Iporã e Rolândia – PR, abastecidos pelo sistema de abastecimento público, apenas sete escolas (6,54%) apresentavam água imprópria para consumo do ponto de vista microbiológico (MATSUCHITA et al., 2014), enfatizando a importância do tratamento da água para a prevenção de contaminação por coliformes totais e prevalência de contaminação em água subterrânea.

Uma pesquisa realizada em um assentamento na Amazônia – Brasil, onde foram selecionados 20 poços rasos responsáveis por abastecer 39 famílias, constatou que todas as amostras de água estavam contaminadas por coliformes totais e *E. coli* (FERREIRA, LUZ, BUSS, 2016). Queiroz et al. (2014) analisaram a água de 12 pontos de coleta diferentes em um assentamento no Mato Grosso - Brasil, diversificando entre minas, córregos, rios e poços rasos, durante 6 meses, e todos os pontos de coleta apresentaram contaminação por coliformes totais em pelo menos um dos meses avaliados.

2.3 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, que faz parte da microbiota intestinal humana, beneficiando o seu hospedeiro, porém algumas cepas dessa espécie podem desenvolver ou adquirir mecanismos de patogenicidade provocando infecções (NATARO; KAPER, 1998).

Desde a sua identificação, em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich, *E. coli* continua sendo uma das bactérias mais estudadas no mundo (NATARO; KAPER, 1998). *E. coli* diarreio gênica (DEC) são uma das causas relacionadas a infecções gastrointestinais, tanto em adultos como em crianças, e estão divididas em oito grupos, de acordo com seus fatores de virulência específicos e características fenotípicas. O grupo das DEC é classificado como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012), sendo os cinco primeiros, os principais patotipos pesquisados.

As cepas de DEC evoluíram adquirindo, por meio da transferência horizontal de genes, um conjunto de características típicas responsáveis por persistir causando doenças nos hospedeiros (MÉDIGUE et al., 1991; GOMES et al., 2016). Ilhas de patogenicidade responsáveis por codificar importantes fatores de virulência, encontrados especialmente em genomas de cepas patogênicas, diferem-se do genoma de *E. coli* comensais, indicando que podem ter sido adquiridos de outras espécies (DONNENBERG; WHITTAM, 2001).

E. coli apresenta diferentes grupos antigênicos e são identificados e caracterizados por diversas combinações do antígeno O (antígeno da parede celular), antígeno K (antígeno capsular) e antígeno H (antígeno flagelar) dando origem a vários sorotipos (EWING, 1986). Na literatura encontram-se descritos aproximadamente 188 antígenos O. Em adição, também foram descritos, pelo menos 53 antígenos H e 74 antígenos K diferentes, possibilitando inúmeras combinações (FRATAMICO, 2016).

Análises filogenéticas têm mostrado que cepas de *E. coli* são classificadas em sete principais grupos filogenéticos: 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).

As doenças diarreicas constituem uma importante causa de mortalidade e morbidade mundial. Estima-se que em 2010 houve mais de 1,7 bilhões de episódios de diarreia em todo o mundo (LIU et al., 2012), dos quais levaram à morte de aproximadamente 700.000 crianças menores de cinco anos de idade (WALKER et al., 2013). DEC é uma das causas de diarreias, demonstrando assim, a necessidade de implantação de um sistema de vigilância para os patógenos entéricos, devido a sua grande importância para a saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos como o Quênia (SHAH et al., 2016).

2.4 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

EPEC foi a primeira categoria de DEC a ser descoberta durante um surto de diarreia infantil ocorrido por volta dos anos 1940 e 1950 (BRAY, 1945; ROBINS-BROWNE, 1987), entretanto a sua identificação foi descrita somente em 1955, por Neter et al. (1955). Anteriormente definida apenas com base nos sorotipos O e H, EPEC também passou a ser definida com base em características patogênicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; GOMES et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1987), as cepas de EPEC são classificadas em doze sorogrupos O: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158, considerados como sorogrupos clássicos de EPEC.

O principal mecanismo de patogenicidade de EPEC é caracterizado pela capacidade de induzir lesões A/E (*attaching-effacing*) em células do epitélio intestinal e ausência da produção de toxina Shiga. Nas lesões A/E, ocorre uma adesão íntima da bactéria aos enterócitos, promovendo a destruição das microvilosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e a formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, reorganizando o citoesqueleto sobre o qual a bactéria se encontra aderida (MOON et al., 1983; KNUTTON et al., 1989).

A lesão A/E é formada através da expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI) de 35 kb presente no cromossomo, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (MCDANIEL et al., 1995) e possui o gene *eae* que codifica uma proteína de membrana externa de 94-kDA denominada intimina, promovendo a ligação da bactéria nas células epiteliais (JERSE et al., 1990), e o gene *tir*, o qual codifica o receptor Tir, que é translocado para a membrana na célula hospedeira funcionando como o receptor da intimina (KENNY et al., 1997).

Existem mais de 30 tipos e subtipos de variantes do gene *eae* descritos em EPEC e EHEC devido às alterações antigênicas decorrentes na extremidade C-terminal da molécula de intimina, que é responsável por se ligar ao receptor Tir (ADU-BOBIE et al., 1998; BLANCO et al., 2006; HORCAJO et al., 2011).

As EPEC foram subdivididas em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), considerando a presença ou ausência do fator de adesão, um plasmídeo de 60 MDa denominado EAF (EPEC *adherence factor*), que possui o gene *bfpA* responsável por codificar uma adesina fimbrial do tipo IV, conhecida como *Bundle-Forming Pilus (bfp)*. As cepas de tEPEC são conhecidas por apresentar, além do gene *eae*, o plasmídeo EAF, já as cepas de aEPEC são caracterizadas por possuir o gene *eae*, mas não apresentar o plasmídeo EAF e, ambas não produzem a toxina Shiga (Stx), o que as diferenciam das EHEC (*eae+* e *stx+*) (KAPER, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Os subtipos de EPEC também podem ser diferenciados através do seu padrão de adesão, que são mediadas pela expressão do BFP. tEPEC possui um padrão de adesão localizada (AL) (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), caracterizado pela formação de microcolônias compactas aderidas na superfície celular, após três horas de incubação em testes com células HeLa e HEp-2 (CRAVIOTO et al., 1979). Em contrapartida, as aEPEC apresentam um padrão de adesão localizada-like (AL-L), caracterizado pela formação de microcolônias mais frouxas, sendo possível visualizar em ensaio mais prolongados, com duração de seis horas (RODRIGUES et al., 1996).

Segundo um estudo realizado por HICKS et al. em 1998, bactérias que possuem a intimina e não possuem a presença do plasmídeo EAF ou possui o gene *bfp* não funcional, conseguem se aderir as células hospedeiras e formar a lesão A/E, porém não formam microcolônias compactas. Sendo assim, o BFP não é considerado necessário para a aderência inicial da bactéria a célula, mas ainda assim é considerado um potencial fator de virulência, acarretando sinais clínicos mais potentes do que as EPEC com EAF negativo (FRANKEL et al., 1998).

O principal sintoma associado a tEPEC é a ocorrência de diarreia aguda, principalmente em crianças até um ano de idade (NATARO; KAPER, 1998), por outro lado, aEPEC provoca diarreia em indivíduos de diversas faixas etárias (HERNANDES et al., 2009). O período de incubação dessa bactéria é de 3 a 24 horas, podendo causar diarreia persistente acompanhada de febre e vômitos (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016).

Uma revisão realizada por Hernandez et al. (2009) relata que cepas de aEPEC podem ser patógenos potencialmente zoonóticos, devido a presença de sorogrupos

associados a diarreia humana identificados em animais. Em contrapartida, cepas de tEPEC raramente são encontradas em animais (NATARO; KAPER, 1998).

A transmissão das EPEC, assim como outros patógenos entéricos, pode ocorrer através do consumo de água e alimentos contaminados pela rota fecal-oral (LEVINE; EDELMAN, 1984). No Japão foi relatado um surto de diarreia transmitida pela água afetando 41 alunos, entre 12 a 15 anos, com a presença de cepas de aEPEC (YATSUYANAGI et al., 2003), outro estudo realizado com amostras de água do Rio La Paz, no Peru, mostrou que 47,2% das cepas de *E. coli* isoladas eram aEPEC (POMA; MAMANI; IÑIGUEZ, 2016).

Uma pesquisa desenvolvida na Noruega com crianças menores de dois anos de idade que apresentaram quadro clínico de diarreia, demonstrou que a aEPEC foi mais prevalente do que outros patógenos entéricos (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003), já um estudo realizado pela *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) em países em desenvolvimento associou significativamente casos de diarreia moderada a severa em crianças de até dois anos de idade com cepas de tEPEC (KOTLOFF et al., 2013). Entre 2012 e 2013 foram isoladas 82 cepas de aEPEC, sendo 68 de casos esporádicos e 14 de cinco surtos de diarreia ocorridos no Brasil (VIEIRA et al., 2016).

Durante anos, o sorotipo de tEPEC foi considerado um importante patógeno relacionado a gastroenterites em crianças, porém estudos realizados no Brasil demonstraram um declínio nos números de isolados de tEPEC e um aumento na frequência de aEPEC (FRANZOLIN, 2005; GOMES et al., 2016). No entanto, outros estudos ainda relatam que tEPEC é mais prevalente do que aEPEC como agente causal de diarreia, principalmente em algumas áreas menos desenvolvidas como África e Ásia (RAJENDRAN; AJJAMPUR; CHIDAMBARAM, 2010; IFEANYI et al., 2015; ODETOYIN et al., 2016).

2.5 *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) E *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

Desde o início dos anos 80, o grupo da STEC, sorotipo O157:H7, surgiu como um importante patógeno de origem alimentar. Foi descrita primeiramente em 1983 durante um surto de doenças gastrointestinais nos Estados Unidos, e esta relacionada com casos de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (RILEY et al., 1983) e colite hemorrágica (CH) (KARMALI et al., 1985). O período de incubação dessa bactéria geralmente ocorre entre três a quatro dias, provocando diarreia sanguinolenta e pode estar acompanhada de dores

abdominais e febre (NATARO; KAPER, 1998), porém também pode causar infecções que não envolvam necessariamente diarreia sanguinolenta (CHART; JENKINS, 1999).

O principal mecanismo de patogenicidade de STEC está associado à produção de dois tipos de citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 e Stx2) (PATON; PATON, 1998), inicialmente conhecidas como Verotoxinas (VT) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STRAVIC, 1977). Estudos posteriores observaram que diversas cepas de STEC expressavam toxinas Stx1 e Stx2 com variações em sua sequência de aminoácidos, sendo subdivididas. A família Stx1 é mais homogênea e inclui Stx1a, Stx1c e Stx1d, enquanto o grupo Stx2 é composto por Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g. Algumas variáveis como Stx2a, Stx2c e Stx2d, se destacam pela associação com casos de CH e SHU (SCHEUTZ et al., 2012; GOMES et al., 2016).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é um subgrupo de STEC que foi originalmente descrito por sua associação com surtos de CH, sendo caracterizado por produzir toxina Shiga e pela presença de um gene homólogo ao *eae* de EPEC (PATON; PATON, 1998). O termo EHEC é aplicado aos sorotipos de STEC que têm as mesmas características clínicas, epidemiológicas e patogênicas associadas com a cepa de *E. coli* O157:H7, responsável por provocar um efeito citopático irreversível nas células hospedeiras (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012).

Algumas cepas de STEC/EHEC são capazes de produzir uma enterohemolisina (Ehly), um tipo de hemolisina que se encontra associada ao plasmídeo pO157 (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995) codificada pelo gene *ehxA*, de aproximadamente 35 kDa (JURGENS et al., 2002). É uma proteína de alta virulência com a capacidade de se inserir na membrana plasmática das células alvos formando poros (BIELASZEWSKA et al., 2014).

O principal reservatório de EHEC é o trato intestinal de bovinos, o que explica os grandes surtos associados ao consumo de carne bovina malcozida (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). No entanto, existem outras espécies de animais que atuam como reservatórios, por exemplo, as ovelhas, cabras e cervos. Alguns animais não são considerados reservatórios, e sim, hospedeiros disseminadores, que quando colonizados por esses patógenos podem transmitir a doença, como as aves, suínos, cães e cavalos, porém uma vez que não são mais expostos a uma fonte de STEC, eles não mantêm a colonização dessas bactérias. Esse é o fator crítico que diferencia esses animais dos reservatórios (PERSAD; LEJEUNE, 2014). Alimentos contaminados com esse patógeno, como algumas frutas e verduras também podem causar a doença (CROZIER et al., 2016).

As cepas patogênicas são caracterizadas pela sua capacidade de causar doenças através de mecanismos como a produção de toxinas, adesão e invasão em células hospedeiras, interferência no metabolismo das células e destruição de tecidos (CROXEN et al., 2013). A capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme nos alimentos e em vários tipos de superfícies pode ser uma fonte e/ou veículo de transmissão de STEC/EHEC (BISCOLA, ABE, GUTH, 2011), além disso, o biofilme também pode atuar como proteção bacteriana contra condições ambientais, e a sua formação não está relacionada a um sorotipo específico e nem a presença ou ausência de genes de virulência (PICOZZI et al., 2016).

Mais de 400 sorotipos de STEC estão envolvidos em surtos esporádicos relacionados com humanos, que podem variar entre uma diarreia leve a uma CH e SHU nos casos mais graves. Entre eles, o sorotipo O157:H7 é considerado o patógeno mais importante clinicamente (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016). *E. coli* O104:H4 implicada em um surto em 2011 no norte da Alemanha, causou o maior número de casos de SHU (852) e mortes (50) já registrado em um único surto de *E. coli*. Apesar da *E. coli* O104:H4 possuir fatores de virulência tanto de STEC (*Stx2a*, *lpfAO26* e *ter*) como de EAEC (*sigA*, *pic*, *aggR* e outros genes do plasmídeo pAA) e de ExPEC (*irp2*, *fyuA*, *iha*, *aer*) seus mecanismos de patogênese ainda não são bem conhecidos (MORA et al., 2011). Estes dados levaram ao surgimento de mais um patotipo de DEC denominado de *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina shiga (STEAEC) que tem ancestrais de STEC e EAEC (CLEMENTS et al., 2012).

No Brasil, muitas fontes de água não tratadas, como águas superficiais de rios, nascentes e poços rasos, são utilizadas como água potável, onde as populações mais afetadas são aquelas que vivem em periferias urbanas e comunidades rurais (LASCOWSKI et al., 2013; SCHUROFF et al., 2014) e ainda, há poucos dados publicados sobre o monitoramento de STEC e EPEC nas fontes brasileiras de água potável.

2.6 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

EAEC é um patógeno emergente responsável por causar diarreia aguda e persistente, sendo capaz de promover a desnutrição e retardamento no crescimento de crianças. Têm sido associadas à “diarreia do viajante” tanto nos países em desenvolvimento como em industrializados (NATARO; KAPER, 1998; GOMES et al., 2016). A diarreia causada por esses patógenos possui a consistência aquosa, com presença de muco, com ou sem sangue, pode estar acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre baixa. Em alguns casos pode ter duração de até 14 dias, sendo considerada como persistente (HEBBELSTRUP

et al., 2014). O mecanismo básico de patogenicidade de EAEC consiste na colonização da mucosa intestinal e na produção de enterotoxinas e citotoxinas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Esse grupo é caracterizado pelo seu padrão de adesão em células HEp-2, denominada de padrão agregativo (AA), em que as bactérias se agregam uma as outras em um modelo de “tijolo empilhado” e se aderem também nas lamínulas e entre as células. O padrão de adesão AA é considerado o padrão “ouro” para a caracterização das EAEC (NATARO et al., 1985), porém esse padrão pode ser encontrado em outros patotipos de DEC, necessitando a presença de marcadores moleculares para confirmar (NATARO; KAPER; 1998).

O fenótipo do padrão de adesão AA e a formação de biofilme, está associado a uma adesina fimbrial denominada AAF (*Aggregative Adherence Fimbriae*), que possui cinco variantes (AAF/I-AAF/V), sendo reguladas pelas variantes do ativador de transcrição *aggR* (*aggregative adherence regulator*) (*aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A* e *agg5A*) (NATARO et al., 1992; BOISEN et al., 2008; JONSSON et al., 2015). O gene transcricional (*aggR*), assim como outros fatores de virulência, como a proteína antiagregativa (*aap*) (*anti-aggregation protein dispersin*), as enterotoxinas EAST1 e Pet codificada pelos genes *astA* e *pet*, o gene transportador da proteína antiagregativa (*aat*), são codificados por um plasmídeo de alto peso molecular (55-65 MDa), conhecido como pAA (CZECZULIN et al., 1999)

As cepas de EAEC que apresentam o gene *aggR* são denominadas típicas e as que não possuem o gene *aggR*, mas apresentam o padrão de adesão agregativo, são conhecidas como atípicas (NATARO; KAPER; 1998). O gene *aggR* é responsável por promover a expressão de diversos fatores de virulência tanto plasmidiais quanto cromossomais, incluindo as AAFs e a dispersina (DUDLEY et al., 2006).

Entre os genes cromossomais regulados pelo *aggR*, estão o *aaiC* e o *aaiA*, que se encontram em uma ilha de patogenicidade inserida em *pheU*, responsável por codificar componentes do sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al., 2006).

As cepas desse patotipo possuem uma proteína hidrofílica que promove a diminuição na autoagregação bacteriana, através da neutralização da carga negativa dos lipopolissacarídeos, permitindo que as fímbrias AAF se estendam pelas células, favorecendo assim a sua dispersão ao longo da mucosa intestinal. Essa proteína antiagregativa é nomeada de dispersina e codificada pelo gene *aap* (SHEIKH et al., 2002), e é transportada para fora da célula bacteriana por uma proteína transportadora, codificada pelo gene *aatA* (*anti-aggregation protein transporter*), anteriormente conhecido como sonda CVD432 (BAUDRY et al., 1990; NISHI et al., 2003).

Outra proteína que ajuda na colonização da EAEC é conhecida como Pic, uma protease com atividade mucinolítica e hemaglutinina que ajuda a penetrar nos enterócitos (HENDERSON et al., 1999) causando uma hipersecreção do muco, contribuindo para que a bactéria permaneça por mais tempo aderida a mucosa (NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Um número crescente de EAEC que causa diarreia aguda, persistente e do viajante tem sido associado ao consumo de água e alimentos contaminados (KARAM et al., 2017). Cepas de DEC foram detectadas em 23,3% dos pacientes internados com diarreia aguda no México, sendo que a maior porcentagem dos isolados foi de EAEC (12,2%), e em crianças menores de dois anos, demonstrando a prevalência desse patotipo em crianças (CANIZALEZ-ROMAN et al., 2016).

Um estudo demonstrou a prevalência de isolados de EAEC em crianças de até cinco anos de idade, hospitalizadas com diarreia no Quênia, e isto, pode ser caracterizado devido ao sistema imunológico ainda estar subdesenvolvido e a incapacidade de uma resposta imune efetiva, sendo que a maior parte dos isolados foi em crianças de 0 a 18 meses (SHAH et al., 2016), semelhante a outro estudo realizado no Brasil, em que EAEC foi o patotipo mais prevalente (20,9%) dentre as DEC (LOZER et al., 2013).

2.7 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

ETEC foi descoberta em 1968 (GORBACH et al., 1971), sendo considerada a principal causa de “diarreia do viajante”, provocando diarreia aquosa, que varia de leve até um grau mais severo, atingindo todas as idades, e ocorre principalmente em regiões endêmicas e em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER; 1998). O grupo é considerado heterogêneo por abrigar diferentes elementos genéticos e pelas características fenotípicas, incluindo a grande diversidade de lipopolisacarídeos (LPS), a expressão de diferentes fatores de colonização (CFs) e toxinas (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996)

Os CFs foram os primeiros fatores de virulência descritos em ETEC (EVANS et al., 1975) e devido a sua importância, existem estudos que investigam a produção de vacinas para ETEC com base nesses fatores (WALKER; STEELE; AGUADO, 2007).

As cepas de ETEC são caracterizadas pela produção das enterotoxinas: termo lábil (LT) e toxina termo estável (ST) (NATARO; KAPER; 1998; GOMES et al., 2016). O mecanismo de patogenicidade de ETEC é colonizar a superfície da mucosa do intestino delgado e liberar enterotoxinas, que promovem uma desregulação nos canais de

membrana do epitélio intestinal, aumentando a secreção de água e eletrólitos da mucosa, sendo capaz de provocar desidratação em poucas horas (FINKELSTEIN et al., 1976).

A toxina ST é dividida em duas classes, STa (ST-I) e STb (ST-II), que se diferem na estrutura e no mecanismo de ação, ambas as variantes podem ser encontradas em humanos (ALI et al., 2012). A toxina STa é semelhante ao hormônio guanilina presente no intestino, que age ligando e ativando o receptor GC-C (guanilato ciclase), aumentando os níveis de GMP cíclico intracelular provocando uma desregulação na absorção e secreção de íons, desencadeando assim, a diarreia aquosa (SEARS; KAPER, 1996).

A toxina LT é subdividida em LT-I geralmente isolada de humanos, e LT-II isoladas de animais e raramente de humanos, e são transportadas através da membrana externa pelo sistema de secreção do tipo II (TAUSCHEK et al., 2002). Esta toxina pertence ao grupo AB₅, ou seja, é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B. A LT se liga através da subunidade B nos receptores específicos presente no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana e é secretada para o interior da célula hospedeira pelo mecanismo de endocitose. Essas reações produzem um aumento de AMP cíclico, que estimula a secreção de cloreto e outros eletrólitos (SPANGLER, 1992).

As cepas de ETEC estão relacionadas a diversos casos de diarreia, como mostra o trabalho realizado com crianças entre 0 a 5 anos de idade com diarreia aguda na Nigéria, das 400 amostras coletadas, foram detectadas DEC em 51 e entre elas, 16 apresentava ETEC (IFEANYI et al., 2015), já em pacientes no México, dos 242 isolados de *E. coli*, 43 eram ETEC (CANIZALEZ-ROMAN et al., 2016).

A diarreia provocada por esses patógenos pode ser o resultado da ingestão de alimentos e água contaminada (NATARO; KAPER, 1998; GOMES et al., 2016). De acordo com um estudo realizado com amostras de água superficial de um rio na Índia, 40% dos isolados foram de ETEC (RAM et al., 2009) e no Aby Lagoon, que atravessa a Costa do Marfim e Gana, de 62 amostras de água, 37 (60%) foram positivas para ETEC (KAMBIRE et al., 2017). Em amostras de água do Rio La Paz no Peru, utilizada para irrigação e despejos sanitários de hospitais, verificou que o patotipo de ETEC (94,4%) foi o mais encontrado entre as amostras que foram positivas para coliformes termotolerantes, e de 24 amostras de vegetais frescos analisados, ETEC estava presente em 67% das amostras (POMA; MAMAN; IÑIGUEZ, 2016). No Brasil, Cestari et al. (2016) realizaram um trabalho pesquisando ETEC em 295 cepas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano e encontrou a presença de ETEC em 36 (12,2%) dos isolados.

2.7 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASORA (EIEC)

EIEC foi descrita pela primeira vez em 1947 (EWING; GRAVATTI, 1947) e difere das outras categorias de DEC por não descarboxilar a lisina, não fermentar lactose (ou fermentar tardiamente) e por ser imóvel, exceto o sorogrupo O124 (SILVA; TOLEDO; TRABULSI, 1980). Este grupo possui propriedades genéticas, bioquímicas e a capacidade de invadir as células do hospedeiro semelhante à *Shigella* spp. (FORMAL; HORNIK, 1978).

Os sintomas característicos causados pela EIEC são diarreia aguda com a presença de sangue, muco e dor abdominal, porém, em alguns casos, ocorre apenas a diarreia, dificultando o diagnóstico, devido à semelhança dos sintomas produzidos pela ETEC e os casos menos graves causados pela *Shigella* (NATARO; KAPER; 1998).

EIEC consegue evadir da resposta imunológica no hospedeiro, penetrando nas células epiteliais do cólon através de adesinas, movendo-se lateralmente para invadir outras células (SCHROEDER; HILBI, 2008). Estas bactérias ligam-se especificamente as células M presente na mucosa do intestino grosso, invadem as células por endocitose e induzem ou inibem as vias de sinalização celular, esse mecanismo de invasão e penetração promove a destruição das células hospedeiras (LEVINE, 1987).

Os genes necessários para a patogenicidade de EIEC estão albergados em um plasmídeo de virulência de 140 MDa, muito semelhante ao encontrado em *Shigella* spp (SANSONETTI; KOPECKO; FORMAL, 1982). Este plasmídeo codifica um sistema de secreção do tipo III que resulta em diversos fatores de patogenicidade, como a secreção de proteínas, entre elas: IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, que promovem eventos como a sinalização das células epiteliais, o rearranjo do citoesqueleto e a lise de vacúolos endocíticos (CLEMENTS et al., 2012).

A ocorrência de surtos relacionados à presença de EIEC é menor em relação às outras categorias de DEC. Em um estudo realizado no Brasil com amostras de fezes isoladas de 560 crianças com e sem diarreia, EIEC foi isolada em 0,5% das amostras, demonstrando a baixa prevalência desse patotipo de DEC (LOZER et al., 2013). Em Abuja, Nigéria, pesquisaram DEC em 400 amostras de fezes de crianças com diarreia e encontraram 12,8% de DEC, no qual EIEC foi encontrada em apenas 0,8% (IFEANYI et al., 2015). Na última década, apenas alguns episódios de EIEC associados à doença foram relatados em estudos na América Central e do Sul, África e Ásia (CROXEN et al., 2013).

Assim observamos que as doenças diarreicas constituem uma importante causa de mortalidade e morbidade mundial, salientando a necessidade de estudos de vigilância epidemiológica, a fim de diminuir o risco de ocorrência desses patógenos. Dados epidemiológicos recentes têm demonstrado que uma grande parcela da população mundial

ainda carece de água potável e de condição higiênica sanitária adequada, estando sujeitas a contrair infecções.

2.8 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

2.8.1 Turbidez

A turbidez da água é ocasionada devido à presença de materiais sólidos em suspensão que reduzem a sua transparência, alterando a penetração da luz através da difusão e absorção, dando à água uma aparência turva. O material em suspensão permite que ocorram áreas em que eventuais microrganismos patogênicos presentes não entrem em contato com a substância desinfetante (PALUDO, 2010). A própria natureza das rochas pode provocar uma alteração na turbidez da água, vista como um problema para os consumidores que usam água de poços (MARAN et al., 2016).

1.3.2 Fluoreto

A adição de flúor na água de abastecimento público surgiu em 1945 nos Estados Unidos e Canadá, com o objetivo de prevenir a cárie dentária (FERREIRA et al., 2014). Esse método foi um dos principais fatores responsável pelo declínio de 60% da prevalência de cárie em crianças nos Estados Unidos (*The United States Department of Health and Human Services*, 2015). Por outro lado, a exposição excessiva ao flúor pode ser prejudicial, levando o indivíduo a fluorose – uma doença crônica que ocorre devido ao excesso da ingestão de flúor (MARAN et al., 2016). A OMS definiu que o limite de flúor em águas é de 1,5 mg de fluoreto para cada litro de água (BRASIL 2011).

Referências

ADU-BOBIE, J. et al. Detection of intimins α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.3, p. 662-668, 1998.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52, p. 1015–1019, 2003.

ALI, M. M. et al. Molecular Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n.5, p. 866–871, 2012.

AMARAL, L. A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 510-4, 2003.

ARAÚJO, G. F. R. et al. Qualidade físico-química e microbiológica da água para o consumo humano e a relação com a saúde: estudo em uma comunidade rural no estado de São Paulo. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v. 35, n.1, p. 98-104, 2011.

ARAÚJO, S. Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. **International Journal Food Microbiology**, v. 257, p. 192-200, 2017.

BARROS, E. F. S. **Avaliação do saneamento ambiental em assentamentos de reforma agrária utilizando o método de análise hierárquica de processos**. 2013. 216 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 6, p. 1249-51, 1990.

BIELASZEWSKA, M. et al. Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 304, n. 5-6, 2014.

BISCOLA, F. T.; ABE, C. M; GUTH B. E. C. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.7, p. 2201–2208, 2011.

BLANCO, M. et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology**, v. 9, p.103–110, 2006.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 7, p. 3281–92, 2008.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 dez. 2011.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 57, n. 2, p. 239–247, 1945.

BURGOS, T. N. et al. Água de consumo humano proveniente de poços rasos como fator de risco de doenças de veiculação hídrica. **Revista Ciência e Saúde**, v.16, n. 1, p. 34-38, 2014.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3657-3703, 2010.

CANIZALEZ-ROMAN, A. et al. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1924, 2016.

CESTARI, S. E. et al. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia Coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 139-143, 2016.

CHART, H.; JENKINS, C. The serodiagnosis of infections caused by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 731-740, 1999.

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

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

COX. P. et al. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5929–5934, 2005.

CZECZULIN J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 67, p.2692–2699, 1999.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

CROZIER, L. et al. Whole-Transcriptome Analysis of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 (Sakai) Suggests Plant-Species-Specific Metabolic Responses on Exposure to Spinach and Lettuce Extracts. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1088, 2016.

CURTIS, V.; CAIRNCROSS, S.; YONLI, R. Review: Domestic hygiene and diarrhoea – pinpointing the problem. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, n. 1, p. 22–32, 2000.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, 2001.

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

DUNN, G. A et al. A comparative analysis of current microbial water quality risk assessment and management practices in British Columbia and Ontario, Canada. **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 544–552, 2014.

EVANS, D. G. et al. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infection and Immunity**, v. 12, n.3, p. 656-667, 1975.

EWING, W.H.; GRAVATTI, J. L. *Shigella* types encountered in the mediterranean area. **Journal of Bacteriology**, v. 53, n. 2, p. 191–195, 1947.

EWING, W.H. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4nd ed. **Elsevier Science Publishing Company**, NY: Elsevier Science Publishing Company;1986.

FARFÁN-GARCÍA, A. E. et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 4, p. 438-450, 2016.

FERREIRA, R. G. L. A. et al. Fluoretação das águas de abastecimento público no Brasil: o olhar de lideranças de saúde. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, p. 1884-1890, 2014.

- FERREIRA, D. C.; LUZ, S. L. B.; BUSS, D. F. Avaliação de cloradores simplificados por difusão para descontaminação de água de poços em assentamento rural na Amazônia, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 3, p. 767-776, 2016.
- FRATAMICO, P.M.; DEBROY, C.; NEEDLEMAN, D.S. Editorial: Emerging approaches for typing, detection, characterization and traceback of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.6-8, 2016.
- FINKELSTEIN, R. A. et al. Clinical cholera caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 3, n. 3, p. 382-384, 1976.
- FORMAL, S. B.; HORNIK, R. B. Invasive *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 5, p. 641–644, 1978.
- FRANKEL, G. et al. *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30 p. 911-921, 1998.
- FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359–363.116, 2005.
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Saneamento ambiental, sustentabilidade e permacultura em assentamentos rurais: algumas práticas e vivências. **FUNASA**. Brasília, 2014.
- GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiology**, v. 4, n.11, p. 444–452, 1996.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 178, p. 28, 2016.
- GORBACH, S. L. et al. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. **Journal of Clinical Investigation**. v. 50, n. 4, p. 881-889, 1971.
- HEBBELSTRUP, J. B. et al. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 27, n.3, p. 614–630, 2014.
- HENDERSON, I. R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 11, p. 5587-96, 1999.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 297, p. 137–149, 2009.

- HICKS, S. et al. Role of intimin and bundle forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestine in vitro. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 1570–1578, 1998.
- HORCAJO, P. et al. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. **Veterinary Microbiology**. v. 155, p. 341–348, 2011.
- IFEANYI, C. I. C. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v. 9, n. 2, p. 165-174, 2015.
- JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal of Microbiol.** v. 4, n. 3, p. 102-117, 2012.
- JONSSON, R. et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 83, n. 4, p. 1396–1405, 2015.
- JURGENS, D.; OZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N. B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of Erythrocyte membranes. **Cell Biology International**. v. 26, n. 2, 175–186, 2002.
- KAPER, J. B. Defining EPEC. **Review Microbiology**. v. 27, p. 130-133, 1996.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 124-140, 2004.
- KARAM, M. R. A., et al. Evaluation of Prevalence, Homology and Immunogenicity of Dispersin among Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Iran. **Iranian Biomedical Journal**, v. 21, n.1, p. 40-47, 2017.
- KARMALI, M. A. et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**. v. 151, p. 775-782, 1985.
- KAMBIRE, O. et al. Prevalence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes of *Escherichia coli* Isolates from Water, Sediment, Fish, and Crab in Aby Lagoon, Côte d'Ivoire. **International Journal of Medical Microbiology**. p. 1-8, 2017
- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511–520, 1997.
- JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesion on tissue culture cells. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290-1298, 1989.

LAINE, J. et al. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 7, p. 1105-1113, 2011.

LASCOWSKI, K. M. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. 114, 1230-1239, 2013.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 15, p. 5:377-389, 1987.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**. v. 6, p. 31-51, 1984.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an up dated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**. v. 379, p. 2151-2161, 2012.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**. v. 13, p. 418, 2013.

MARAN, N. H. et al. Depth and Well Type Related to Groundwater Microbiological Contamination. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, p. 1036, 2016.

MATSUCHITA, H. L. P. et al. Qualidade bacteriológica da água de abastecimento público de Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) das cidades de Londrina, Cambé, Ibiporã e Rolândia, PR. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 13, n. 1, p. 60-63, 2014.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MÉDIGUE, C. et al. Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. **Journal of Molecular Biology**. v. 222, n. 4, p. 851-856, 1991.

MORA, A. et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. **International Microbiology**, v.14, n. 3, p. 121-141, 2011.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines **Infection and Immunity**. v. 41, n. 3, p. 1340-1351, set. 1983.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**. v. 11, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P. et al. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 48, p. 378-83, 1985.

NAVARRO-GARCIA. F. et al. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infection and Immunity**. v. 78, n. 10, p. 4101-9, 2010.

NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.

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

ODETOYIN, B. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* in mother–child pairs in Ile-Ife, South Western Nigeria. **BMC Infectious Diseases**. 6: 28, 2016.

PALUDO, D. **Qualidade da água nos poços artesianos do município de Santa Clara do Sul**. 2010. p. 75. Monografia (Graduação em Química industrial) – Centro Universitário UNIVATES. Lajeado, 2010.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 598–602, 1998.

- PERSAD, A. K.; LEJEUNE, J. T. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**. v. 2, n. 4, 2014.
- POMA, V.; MAMANI, N.; IÑIGUEZ, V. Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. **Springer Plus**, v. 5, p. 499, 2016.
- PICOZZI, C. et al. Genotypic Characterization and Biofilm Formation of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. 364, 2017.
- PRÜSS-USTÜN, A. et al. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low- and middle-income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 8, p. 894–905, 2014.
- QUEIROZ, T.M., et al. Caracterização microbiológica da água consumida pela comunidade assentamento Vão Grande, Município de Barra do Bugres/MT. **Acta Iguazu**, v.3, n.4, p. 145-154, 2014.
- RAJENDRAN, P. et al. Impact of urban contamination of the Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 68, n. 2, p. 117–122, 2010.
- RAM, S. et. al. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 490–495, 2009.
- RHEINHEIMER, D. D. S. et al. Qualidade de águas subterrâneas captadas em fontes em função da presença de proteção física e de sua posição na paisagem. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 5, p. 948-957, 2010.
- RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.
- ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 9, n.1, p. 28–53, 1987.
- RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strain of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**. v.64, p. 2680-2686, 1996.
- SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**. v. 35, n. 3, p. 852–860, 1982.

- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**. v. 45, p. 534-6, 1984.
- SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 2951–2963, 2012.
- SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, 701–705, 1995.
- SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical Microbiology Reviews**. 21:134-56, 2008.
- SCHUROFF, P. et al. Microbiological water quality of Igapó Lake Londrina - PR and genotypic characterization of virulence factors associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 35 (2), p. 11-20, jul/dez, 2014.
- SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 60, n.1, p. 167–215, 1996.
- SHAH, M. et al. Prevalence, seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya. **Tropical Medicine and Health**. v. 44, n. 39, 2016.
- SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation** v. 110, n. 9, p. 1329-37, 2002.
- SILVA, R. M.; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI L. R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 441–444, 1980.
- SOUSA, M. M. F. As políticas sociais públicas no âmbito da reforma agrária e sua efetivação no projeto de assentamento Chico Mendes no município de Icó – Ceará. In: **JORNADA INTERNACIONAL DE POLÍTICAS PÚBLICAS**, 6, 2013, São Luís/ Maranhão. Anais. p. 11.
- SPANGLER, B. Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 56, n. 4, p. 622–647, 1992.

- TAUSCHEK, M. et al. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n.10, p. 7066-71, 2002.
- TAVARES, T. M. et al. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2005.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, p. 508-513, 2002.
- VIEIRA, M. A. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v. 65, p. 998–1006, 2016.
- U.S. Department of Health and Human Services Federal Panel on Community Water Fluoridation. U.S. Public Health Service Recommendation for Fluoride Concentration in Drinking Water for the Prevention of Dental Caries. **PHS Recommendation for Fluoride Concentration in Drinking Water**, v. 130, p. 318-331, 2015.
- WALKER, R. I.; STEELE, T.; AGUADO, D. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. **Vaccine**. v. 25, n.14, p. 2545-2566, 2007.
- WALKER, C. L. et al. Global burden of child hood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**. v. 381, n. 9875, p1405–1416, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) and the UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND (UNICEF), Joint Monitoring Programme (JMP), **Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017**.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev. 1). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections**. Geneva, 1987.
- YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 2033–2039, 2003.

3 OBJETIVOS

1.9 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química da água e investigar a prevalência de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC), por meio da caracterização genotípica e fenotípica de fatores de virulência de cepas de *E. coli*, isoladas de amostras de água de um assentamento localizado na região Norte do Estado do Paraná, Brasil.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise microbiológica da água pela técnica do substrato cromogênico Colilert®;
- Análise de turbidez e flúor da água;
- Determinar a prevalência de DEC através da detecção dos genes de fatores de virulência pela técnica da PCR;
- Caracterizar os padrões de adesão em células HEp-2;
- Verificar a formação de biofilme;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de uso clínico;
- Realizar a filogenia;
- Determinar os sorotipos prevalentes.

5 Trabalho científico

CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA ISOLADA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA PARA CONSUMO HUMANO EM UM ASSENTAMENTO RURAL

CHARACTERIZATION OF DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* ISOLATED FROM UNDERGROUND WATER FOR HUMAN CONSUMPTION IN A RURAL SETTLEMENT

Kawana Hiromori Macedo¹; Caroline Rodrigues da Silva¹; Angélica Marim Lopes Dambrozio¹; Anahí Lara Klein¹; Matheus Silva Sanches¹; Sérgio Paulo Dejato da Rocha¹; Armando Navarro²; Jacinta Sanchez Pelayo^{1*}.

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

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

* **Correspondência:** Fone: +55 (43) 3371-4494;

E-mail: jspelajo@gmail.com

Resumo

Introdução: Doenças transmitidas pela água são originadas em sua maioria por contato com patógenos entéricos, sendo o grupo das *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC) um importante agente de infecções gastrointestinais em adultos e crianças. **Objetivo:** Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de água subterrânea *in natura* para consumo, e caracterizar os isolados de *E. coli*. **Materiais e métodos:** Foram coletadas 58 amostras de água subterrânea em um assentamento rural. Os isolados de *E. coli* foram caracterizados genotipicamente dentro dos patótipos de DEC, pela técnica da PCR (gene *eae*, *bpfA*, *stx1*, *stx2*, *Lt*, *St-Ia*, *St-Ib*, *ipaH*, *aaiA*, *aaiC*, *aatA* e *aggR*), e caracterizados fenotipicamente quanto a formação de biofilme, adesão em células HEP-2, sensibilidade a antimicrobianos, filogenia e sorotipagem. **Resultados:** Todas as amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e 36 (62,1%) por *E. coli*. Foram identificadas DEC em 6,89% das amostras de água que apresentaram *E. coli*: três (5,17%) ETEC e uma (1,72%) EAEC. Em células HEP-2, EAEC apresentou adesão agregativa e as três cepas de ETEC apresentaram diferentes padrões de adesão: difusa, agregativa e não definida. Todas as DEC foram formadoras de biofilme. Dois isolados de ETEC apresentaram resistência a ampicilina e tetraciclina, uma ETEC, a aminoglicosídeos, e EAEC foi sensível a todos os antibióticos testados. Segundo a filogenia, todas as ETEC foram classificadas no filogrupo B1 e a EAEC no filogrupo E. Os sorotipos encontrados foram: EAEC O24:H21 e ETEC OR:H21, O17:H46 e O6:H12. As análises físico-químicas mostraram que todas as amostras estavam dentro dos parâmetros normais de flúor e 13 (22,4%) apresentaram resultados acima do padrão permitido de turbidez. **Conclusão:** A presença de *E. coli* e DEC nas amostras de água analisadas indica a necessidade de adoção de medidas que evitem a contaminação da água fornecida à população do assentamento rural analisado, evitando assim, a transmissão de doenças.

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreio gênica, água subterrânea, assentamento rural.

Abstract

Introduction: Water-borne diseases are mostly caused by contamination with enteric pathogens, and bacteria in the diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) group are important agents of gastrointestinal disease in adults and children. **Objective:** Evaluate the microbiological and physicochemical quality of *in natura* groundwater samples for human consumption and characterize *E. coli* isolates. **Material and Methods:** Were collected 58 water samples from a rural settlement. The *E. coli* isolates were characterized genotypically according to DEC pathotypes by PCR (*eae*, *bpfA*, *stx1*, *stx2*, *Lt*, *St-Ib*, *St-Ib*, *ipaH*, *aaiA*, *aaiC*, *aatA*, and *aggR*). Phylogeny and serotyping, antibiotic resistance, biofilm formation, and adherence in HEp-2 cells were also characterized. **Results:** All water samples presented contamination with total coliforms, and 36 (62.1%) with *E. coli*. DEC was identified in 6.89% of the water samples with *E. coli*: three (5.17%) with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and one (1.72%) with enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Regarding adherence patterns, EAEC showed aggregative adherence, whereas various ETEC strains presented diffuse, aggregative, and non-defined adherence. All DEC strains were biofilm forming. Concerning antibiotic resistance, two isolates of ETEC showed resistance to ampicillin and tetracycline, and one isolate showed resistance to aminoglycosides. The EAEC isolate was sensitive to all antibiotics tested. Based on the phylogeny, all ETEC isolates were classified into phylogenetic group B1, whereas the EAEC isolated clustered with the E phylogenetic group. The serotypes identified in our study were EAEC O24:H21 and ETEC: O17:H46, O6:H12. The physical-chemical analysis showed that all water samples were within normal fluorine parameters; however, measured turbidity was above the permitted standard in 13 (22.4%) samples. **Conclusion:** The presence of *E. coli* and DEC in water samples indicates the need to take action to prevent contamination of water resources accessed by people in this rural settlement to prevent the transmission of diseases.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli*, groundwater, rural settlement.

Introdução

As doenças de veiculação hídrica, consideradas um importante problema de saúde pública, são originadas principalmente do contato com água contaminada com patógenos entéricos ⁽¹⁾. Em países em desenvolvimento, tanto adultos como crianças sofrem de doenças diarreicas infecciosas, sendo, a água, a principal fonte de exposição ⁽²⁾. Segundo a Organização Mundial da Saúde ⁽³⁾, todos os anos, 361 mil crianças com menos de cinco anos, no mundo, morrem devido a diarreia provocada pela falta de saneamento básico e água contaminada.

Em locais como os assentamentos rurais, onde não há infraestrutura adequada e a condição higiênico-sanitária é baixa, é comum não ter abastecimento de água público. Assim, os assentados procuram soluções alternativas, abastecendo-se por meio de água proveniente de fontes subterrâneas, como poços rasos ou minas, que em sua maioria, estão sujeitas a contaminação ^(4,5).

As bactérias do grupo coliforme são frequentemente utilizadas para a avaliação da qualidade microbiológica da água, sendo que, desse grupo, a presença de *Escherichia coli* uma bactéria termotolerante de origem exclusivamente fecal, possui uma grande importância clínica ^(6,7).

E. coli diarreiogênica (DEC) é uma das causas relacionadas a infecções gastrointestinais no homem, e estão divididas em oito grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) ⁽⁸⁾, sendo, os cinco primeiros, os principais patótipos pesquisados.

As cepas de DEC evoluíram adquirindo, mediante a transferência horizontal de genes, um conjunto de características típicas responsáveis por persistirem causando doenças nos hospedeiros ⁽⁹⁾. A diferenciação e a classificação de DEC podem ser realizadas baseadas na presença de diferentes genes de virulência cromossômico e / ou plasmidial que estão ausentes na *E. coli* comensal ⁽¹⁰⁾. A utilização de técnicas moleculares permitiu uma identificação mais rápida dos diferentes patótipos ⁽¹¹⁾, já que os métodos fenotípicos convencionais, como a detecção de toxinas, aderência e testes de invasão necessitam de mais tempo ⁽¹²⁾.

EPEC é caracterizada por provocar uma lesão intestinal conhecida como A/E (*attaching-effacing*) e por possuir os genes *eae* (intimina) e *bfpA* (codifica uma adesina fimbrial do tipo IV) ⁽¹³⁾. São subdivididas em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), considerando a presença ou ausência do gene *bfpA*, respectivamente ⁽¹⁴⁾.

As EAEC são identificadas principalmente pelo padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células, entretanto, devido às dificuldades de realizar esse teste, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de EAEC como alternativa ao teste de adesão ^(15,16). Assim, os genes *aggR* (*aggregative adherence regulator*) e *aatA* (*anti-aggregation protein transporter*), presentes no plasmídeo de alto peso molecular (pAA), bem como os genes cromossômicos *aaiA* e *aaiC*, são os mais utilizados para identificar genotipicamente um maior número de EAEC e para classificar esse grupo em EAEC típica (tEAEC) que apresenta o gene regulador *aggR*, e EAEC atípica (aEAEC) para as que não apresentam esse gene ⁽¹⁵⁾.

STEC é identificada pela presença do gene *stx1* e/ou *stx2* associados à produção da toxina Shiga 1 e 2. EHEC é um subgrupo de STEC, que além de produzir toxina Shiga possui o gene *eae* ⁽¹⁷⁾. ETEC tem dois principais fatores associados à virulência, as enterotoxinas

termo estável (ST) e termo lábil (LT). EIEC é caracterizada pela presença do gene *ipaH*, presente em um plasmídeo de alto peso molecular, associado ao mecanismo de invasão ⁽¹⁰⁾.

Esse estudo teve como propósito avaliar a qualidade microbiológica e físico-química da água em um assentamento rural localizado na região sul do Brasil, e a caracterização genotípica e fenotípica de fatores de virulência de DEC nos isolados de *E. coli* encontradas nas amostras de água analisadas.

Material e métodos

Amostras

O estudo foi realizado com 58 amostras de água *in natura* para consumo humano provenientes de 24 minas e 8 poços rasos de um assentamento com aproximadamente 60 moradias e uma população de 150 habitantes, localizado na região sul do Brasil, coletadas no período de julho a dezembro de 2016. As amostras foram coletadas em frascos de vidro de 500 ml esterilizados e armazenadas a 4°C, sendo analisadas em no máximo 6 horas no Laboratório de Bacteriologia (Departamento de Microbiologia, CCB, UEL/Londrina).

Análise físico-química da água

A caracterização físico-química foi realizada mediante os parâmetros turbidez, pesquisado pelo método Nefelométrico e de fluoreto pela técnica de potenciometria, com um eletrodo íon seletivo de fluoreto de lantânio, segundo o *American Public Health Association* ⁽¹⁸⁾.

Análise de coliformes totais e *Escherichia coli*

A técnica utilizada para detecção e quantificação de coliformes totais e *E. coli* foi a do substrato cromogênico Colilert® (SOVEREIGN – USA), aprovado pelo *American Public Health Association* ⁽¹⁸⁾ e realizada como descrita por Schuroff et al. ⁽¹⁹⁾.

Após a incubação a 37°C por 24 horas das cartelas Quanti-Tray (WP2000), as estimativas quantitativas de Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante.

Isolamento de *Escherichia coli*

Para o isolamento de *E. coli*, foram retiradas alíquotas dos poços amarelos das cartelas do kit cromogênico Colilert® que apresentaram coloração azul-fluorescente frente à luz UV, indicando assim a presença de *E. coli*, e semeadas em placa de ágar MacConkey (MC) (Difco®, USA) sendo incubadas à 37°C por 24 horas. De cada placa de MC foram selecionadas de três a cinco colônias e identificadas bioquimicamente por meio do kit EPM, MILi e Citrato de Simmons (PROBAC, BR). Um total de 170 isolados de *E. coli* foram obtidos e armazenados em caldo infusão de coração e cérebro (BHI) (Difco®) com 20% de glicerol (Sigma®) à -20°C.

Pesquisa de genes de virulência através da PCR

Todos os isolados de *E. coli* foram testados quanto à presença dos genes de virulência de EPEC (*eae*, *bfpA*), STEC (*stx₁*, *stx₂*), EHEC (*eae*, *stx₁* e/ou *stx₂*), EAEC (*aaiC*, *aatA*, *aggR* e *aaiA*), ETEC (*LT*, *ST-Ia* e *ST-Ib*) e EIEC (*ipaH*). Como controle positivo para os genes *eae*, *bfpA* foi utilizada a *E. coli* E2348/69 (O127:H6), para os genes *stx₁*, *stx₂* a EDL933 (*E. coli* O157:H7), para os genes *aaiC*, *aaiA*, *aatA* e *aggR* a EAEC 042 (O44:H18), para os genes *ST-Ia*, *ST-Ib* e *LT* a ETEC H10407 (O78:K80:H11) e para o gene *ipaH* a EIEC FBC124-13 (O124:NM). A cepa HB101 (*E. coli* K-12) foi utilizada como controle negativo para todos os testes.

O DNA bacteriano foi obtido pelo método de extração por fervura segundo Lascowski et al. ⁽²⁰⁾. Os isolados de *E. coli* foram cultivados em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco®) a 37°C por 24 horas. Foram transferidos 1,5 mL da cultura bacteriana para microtubos e em seguida centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi suspenso em 300 µL

de água ultrapura estéril, submetida a fervura por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios da PCR.

As reações de amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA), com um volume final de 25 µL, composto por 200 µM dNTPs (Invitrogen®), 2,5 µM MgCl₂, 1X tampão do PCR, 20 pmol de cada primer (Invitrogen®), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2 µL do lisado bacteriano. As amplificações foram visualizadas em eletroforese de gel de agarose a 1,5% com o corante SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen®). A Tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados que foram utilizados.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos pesquisados e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

| Gene | Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3') | Tamanho dos fragmentos (pb) | Referência |
|--------------|--|-----------------------------|------------|
| <i>bfpA</i> | (F) CAATGGTGCTTGCCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT | 326 | 21 |
| <i>eae</i> | (F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG | 384 | 17 |
| <i>stx1</i> | (F) ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R) AGAACGCCCACTGAGATCATC | 180 | 17 |
| <i>stx2</i> | (F) GGCCTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG | 255 | 17 |
| <i>aaiC</i> | (F) ATTGTCCTCAGGCATTTACACAG (R) ACACCCCTGATAAACAA | 215 | 22 |
| <i>aaiA</i> | (F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTTCAGGATTGCCATTAG | 476 | 23 |
| <i>aatA</i> | (F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT | 630 | 24 |
| <i>aggR</i> | (F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT | 308 | 25 |
| <i>ipaH</i> | (F) GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC | 600 | 26 |
| <i>LT</i> | (F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATTCCCTGTT | 450 | 26 |
| <i>ST-Ia</i> | (F) TCTGTATTATCTTTCCCTC (R) RATAACATCCAGCACAGGC | 186 | 27 |
| <i>ST-Ib</i> | (F) CCCTCAGGATGCTAAACCAG (R) TTAATAGCACCCGGTACAAGC | 166 | 27 |

Teste de adesão em células HEp-2

O teste de adesão foi realizado com todos os isolados de *E. coli*, utilizando-se células epiteliais HEp-2, segundo a técnica descrita por Cravioto et al. ⁽²⁸⁾, após 6 horas de interação bactéria-célula.

Formação de biofilme

A formação de biofilme foi realizada de acordo com o método descrito por Wakimoto et al. ⁽²⁹⁾. A formação de biofilme foi considerada positiva ao apresentar um resultado superior a 0,2 quando realizado uma leitura de densidade óptica (DO) a 570 nm.

Sensibilidade a antimicrobianos

Nas amostras de DEC, a sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de disco difusão em ágar de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* ⁽³⁰⁾. Os seguintes antimicrobianos (Laborclin®, BR) foram testados: ampicilina (10µg), tetraciclina (30 µg), ceftioxina (30µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg), ácido nalidíxico (30µg), piperacilina tazobactam (100/10µg), ampicilina sulbactam (10/10µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg) e cloranfenicol (30µg).

Classificação filogenética

A classificação filogenética foi realizada por PCR com as cepas de DEC. Os genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2, por meio de uma PCR, foram empregados para caracterização dos grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F, de acordo com Clermont et al. ⁽³¹⁾.

Serotipagem

A determinação dos antígenos somáticos (O1-O187) e flagelares (H1-H56) de *E. coli* foi realizada por microaglutinação em placas de 96 poços, segundo a técnica descrita por Navarro et al. ⁽³²⁾.

Resultados

De acordo com os resultados das análises físico-químicas, um total de 13 (22,4%) amostras de água se encontra acima do limite permitido de turbidez e todas estão dentro dos parâmetros de flúor.

Em nosso estudo, foram analisadas 58 amostras de água *in natura* para consumo humano, coletadas de fontes subterrâneas, entre elas, poços rasos e minas, e todas apresentaram contaminação por coliformes totais, e 36 (62,1%) por *E. coli*. Das amostras que apresentaram fluorescência nas cartelas Quanti-Tray (WP2000), foram isoladas 170 cepas de *E. coli* e testadas para a presença de doze genes de virulência que caracterizam os diferentes patótipos de DEC. Foi identificado DEC em quatro amostras de água (11,11%), sendo três (8,33%) amostra com ETEC, em que duas apresentaram o gene *St-Ib* e uma os genes *Lt* e *St-Ia*, e uma (2,77%) EAEC com o gene *aaiA*, sendo caracterizada como aEAEC. Todas as amostras de ETEC foram isoladas de água de mina e a aEAEC de poço raso. Nenhuma amostra apresentou os genes para STEC, EHEC e EIEC. As características genotípicas e fenotípicas das amostras positivas para DEC podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características genóticas e fenóticas das amostras de DEC.

| Amostra | Patotipos de DEC | Genes de virulência | Adesão em células HEp-2. | Grupo filogenético | Sorotipo | Biofilme | Perfil de Resistencia |
|---------|------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|----------|----------|-----------------------|
| 6.3 | aEAEC | <i>aaiA</i> | Adesão Agregativa | E | O24:H21 | + | Sensível |
| 8.4 | ETEC | <i>Lt, St-a</i> | Adesão difusa | B1 | OR:H21 | + | AMP, TET |
| 45.5 | ETEC | <i>St-b</i> | Adesão não definido | B1 | O17:H46 | + | AMP, TET |
| 46.1 | ETEC | <i>St-b</i> | Adesão agregativa | B1 | O6:H12 | + | AMI, GEN |

AMP: Ampicilina; TET: tetraciclina; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina

Segundo os ensaios de aderência em células HEp-2, o padrão AA foi encontrado em 106 (62,36%) isolados de *E. coli*, 15 (8,82%) apresentaram o padrão AD, 17 (10%) não apresentaram um padrão de adesão caracterizado e 32 (18,82%) isolados foram não aderentes. As amostras positivas para DEC apresentaram diferentes padrões de adesão, as cepas de ETEC apresentaram os padrões AD, AA e adesão não definida, e a aEAEC expressou o padrão AA.

Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade de formação do biofilme, 126 (74,12%) cepas exibiram OD 570 nm acima de 0.2, sendo consideradas formadoras de biofilme, e 44 (25,88%) cepas obtiveram OD 570 nm abaixo e/ou igual 0.2, portanto consideradas não formadoras de biofilme. As quatro amostras de DEC encontradas nesse trabalho foram formadoras de biofilme.

Em relação aos antimicrobianos, duas cepas de ETEC, apresentaram resistência a ampicilina e tetraciclina e uma, a amicacina e gentamicina. O isolado de aEAEC foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

De acordo com a análise filogenética, as três amostras de ETEC se enquadraram no filogruppo B1 e a aEAEC no filogruppo E.

Os sorotipos encontrados em nosso estudo foram: EAEC O24:H21 e ETEC OR:H21, O17:H46 e O6:H12.

Discussão

De acordo com as normas da Portaria do Ministério da Saúde nº 2914 de 12/12/2011⁽³³⁾, que estabelece o limite máximo de 1,5 mg/L para fluoreto e 5,0 UNT (Unidade Nefelométrica de Turbidez) para turbidez, todas as amostras analisadas apresentaram limite inferior a 1,5mg/L para fluoreto e estavam dentro dos limites permitidos. Os valores elevados de turbidez estão relacionados a redução da transparência da água e podem ser provocados por partículas em suspensão, pela própria natureza das rochas, ou devido à manutenção inadequada das tubulações, sendo um problema para os consumidores que utilizam água de poço⁽⁵⁾. Um estudo realizado por Scorsafava et al.⁽³⁴⁾ corrobora com os dados obtidos em nosso estudo, em que 10,8% das amostras coletadas de poços e 5,2% de minas, apresentaram alterações nos níveis de turbidez, e que apenas duas amostras estavam acima do limite de flúor.

O Ministério da Saúde, através da Portaria nº 2914 ⁽³³⁾, recomenda que seja analisada a presença de coliformes totais e *E. coli* para avaliar a qualidade microbiológica da água para consumo, e esses microrganismos devem estar ausentes na água consumida.

Os resultados das análises microbiológicas obtidos em nosso estudo foram similares a outro estudo realizado na mesma região ⁽³⁵⁾. Em contrapartida, uma pesquisa realizada com amostras de água coletadas em 107 locais provenientes do sistema de abastecimento público, apenas seis (5,6%) estavam contaminadas com coliformes totais e uma (0,9%) com *E. coli* ⁽³⁶⁾, enfatizando a importância do tratamento da água para a prevenção de contaminação da água subterrânea por microrganismos.

As principais fontes de abastecimento de água no meio rural são de origem subterrânea e em sua maioria não tratadas, fontes sujeitas à contaminação, devido a sua baixa profundidade e proximidade com a superfície do solo, estando exposta ao escoamento de água da chuva que carregam impurezas ⁽³⁷⁾. Aproximadamente 30% das amostras de água foram coletadas durante o período de chuva, podendo ser um dos fatores responsáveis pelos altos índices de contaminação nessas fontes de consumo, já que as condições climáticas favorecem a propagação de patógenos ⁽³⁸⁾.

Das fontes analisadas em nosso estudo 35,29% (12/34) não estavam devidamente protegidas, mantendo-se expostas a fatores contaminantes, como efluentes domésticos e criação de animais próximos as fontes de captação, ficando propícia a altos níveis de bactérias nessa água. Segundo Barros ⁽³⁹⁾, o manuseio incorreto dos sistemas de saneamento gera impactos significativos à salubridade ambiental, sendo capaz de contaminar as águas utilizadas para o consumo humano.

Os grupos de DEC encontrados em nossa pesquisa foram ETEC e EAEC. ETEC é conhecida como o principal agente etiológico da “diarreia dos viajantes”, e EAEC está associada à diarreia aguda e persistente, principalmente em crianças e idosos ^(40,41). A doença diarreica provocada por esses patógenos podem ser o resultado da ingestão de alimentos e água contaminados ⁽⁴²⁾.

No Brasil, Cestari et al. ⁽⁴³⁾ encontrou 36 (12,2%) isolados de ETEC em 295 cepas de *E. coli* isoladas de água *in natura* para consumo humano. Estudos realizados com amostras de água superficial de rios demonstraram uma porcentagem significativa de isolados de ETEC ^(44,45), e em recursos hídricos utilizados para irrigação e em despejos sanitários de hospitais, como ocorre no Rio La Paz no Peru, o patotipo ETEC (94,4%) foi o mais encontrado entre as amostras que foram positivas para coliformes termotolerantes ⁽⁴⁶⁾.

As cepas de ETEC estão relacionadas a diversos casos de diarreia, como mostra o trabalho realizado com crianças entre 0-5 anos de idade com diarreia aguda na Nigéria, que das 400 amostras coletadas, DEC foi encontrada em 51 amostras e entre elas, 16 apresentavam características de ETEC ⁽⁴⁷⁾, já em pacientes no México, dos 242 isolados de DEC, 43 eram ETEC ⁽⁴¹⁾.

EAEC é um importante patógeno emergente em todo o mundo, e que além de causar diarreia pode colonizar o trato gastrointestinal do homem de modo assintomático, levando a uma inflamação intestinal crônica ⁽⁴⁸⁾. Cepas de EAEC são frequentemente associadas à diarreia aguda em crianças, como demonstram estudos anteriores ^(40,41,49), podendo ser transmitidas através de água contaminada ⁽⁵⁰⁾.

Ensaio de aderência em células HEp-2, cultivadas *in vitro*, permitem caracterizar fenotipicamente os diferentes padrões de adesão apresentados pelos patotipos de DEC, classificadas em: adesão localizada (AL), localizada - like (AL-L), difusa (AD) e agregativa (AA) ⁽⁴²⁾. De acordo com a diversidade de resultados encontrados, podemos verificar a necessidade da investigação de genes de virulência para confirmar o patotipo de DEC.

O biofilme é um importante fator que contribui para a persistência da infecção bacteriana na mucosa intestinal, principalmente quando associada à EAEC, facilitando a

evasão da bactéria ao sistema imunológico⁽⁵¹⁾. Bactérias que se encontram em meio aquático estão mais propícias a formar um biofilme de maior intensidade para facilitar a permanência e sobrevivência no meio ambiente⁽⁵²⁾.

Em Bengal, Índia, foi realizada uma pesquisa de DEC em diferentes fontes de água potável e todos os isolados foram resistentes a ampicilina e tetraciclina⁽⁵³⁾. A resistência a antimicrobianos pode estar relacionada ao consumo de alimentos, como frangos de corte, que podem funcionar como reservatório de genes de resistência a antibióticos importantes em medicina veterinária e humana⁽⁵⁴⁾.

Segundo a classificação de Clermont et al.⁽³¹⁾, as cepas de *E. coli* podem ser distribuídas em sete filogrupos: A, B1, B2, C, D, E, F, sendo os filogrupos A, B1, B2 e D os mais encontrados. Em nosso estudo, as três amostras de ETEC se enquadraram no filogrupo B1 e a aEAEC no filogrupo E.

De acordo com um estudo realizado por Von Mentzer et al.⁽⁵⁵⁾, cepas de ETEC são classificadas em cinco principais grupos filogenéticos (A, B1, B2, D e E), sendo os filogrupos A e B1 os mais prevalentes entre as cepas comensais de humanos. Uma pesquisa feita por Araújo et al.⁽⁵⁶⁾ com amostras de água e vegetais, em que no geral, o filogrupo B1 foi o mais predominante (56% dos isolados) em cepas de ETEC, seguido do filogrupo A (22,3%), e o grupo E, um dos menos encontrado, semelhante aos resultados obtidos em nosso estudo.

A distribuição em grupos filogenéticos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas. As cepas pertencentes ao filogrupo B2, e em minoria o filogrupo D, estão frequentemente associados às infecções extraintestinais e com potencial patogênico^(57,58), ao contrário dos filogrupos A e B1. Em uma pesquisa realizada com amostras de águas superficiais, a maioria dos isolados de DEC (39/48) pertencia aos grupos A ou B1⁽⁵⁹⁾. De acordo com Walk et al.⁽⁶⁰⁾ é possível diferenciar as cepas de *E. coli*, através da filogenia, com o seu local de isolamento, onde, os grupos B2 e D são menos frequentes no meio ambiente do que os grupos A e B1, estando em conformidade com os resultados do nosso trabalho.

Em isolados de ETEC, já foram descritos, pelo menos, 100 sorogrupos somáticos (O) e 34 flagelares (H), no entanto há um número limitado de sorotipos associados a doenças infecciosas, como O8:H9, O6:H16, O78:H12 e O25:H42, de maior relevância clínica. Os antígenos somáticos mais prevalentes são O6, O78, O8, O128 e O153, e os antígenos H mais comuns são H12, H16, H21, H45 e H9, e, com uma frequência menor, os antígenos H7, H10 e H28^(61,62). Em nosso estudo, um dos isolados de ETEC apresentou o antígeno O6, encontrado com frequência em outros trabalhos, como em pacientes com diarreia aguda no México, em que esse sorogrupo foi um dos mais comuns⁽⁶³⁾ e também em isolados de fezes de pacientes com diarreia na China⁽⁶⁴⁾. As outras duas amostras de ETEC apresentaram os sorotipos OR:H21 e O17:H46 que não estão entre os mais prevalentes.

Em um estudo realizado por Benevides-Matos et al.⁽⁶⁵⁾ com 1.156 isolados de *E. coli* em crianças com ou sem diarreia aguda, a maioria dos isolados de EAEC pertenciam aos sorogrupos O44, O55, O111, O125 e O127, sendo isolados de crianças que apresentavam um quadro clínico de gastroenterite aguda. O antígeno O24, encontrado em nosso estudo, não é comum em cepas de EAEC, em contrapartida, o antígeno H21 foi encontrado em estudos anteriores^(66,67).

Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que a qualidade microbiológica da água para consumo no assentamento é insatisfatória e apresenta riscos a saúde dessa população. A presença de genes de virulência em cepas de *E. coli*, indica que além da água estar contaminada, abriga cepas com um potencial para causar infecção.

Acknowledgements

We thank the Laboratory of Virology at the State University of Londrina for supplying HEp-2 cell cultures.

Referências

Shanks OC, Domingo JWS, Lu J, Kelty CA, Graham JE. Identification of Bacterial DNA Markers for the Detection of Human Fecal Pollution in Water. Appl Environ Microbiol. 2007;73(8):2416-2422.

Sobsey MD, Handzel T, Venczel L. Chlorination and safe storage of house-hold drinking water in developing countries to reduce waterborne disease. Water Sci Technol. 2003;47(3):221-8

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) and the UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF), Joint Monitoring Programme (JMP), Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017.

Araújo GFR, Tonani KAA, Julião FC, Cardoso OO, Alves RIS, Ragazzi MF, Sampaio CF, Segura-Muñoz SI. Qualidade físico-química e microbiológica da água para o consumo humano e a relação com a saúde: estudo em uma comunidade rural no estado de São Paulo. O Mundo da Saúde. 2011;35(1):98-104.

Maran NH, Crispim BD, Iahnn SR, Araújo RP, Grisolia AB, Oliveira KM. Depth and Well Type Related to Groundwater Microbiological Contamination. Int J Environ Res Public Health. 2016;13(10):1036-1044.

Cabral JPS. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Int J Environ Res Public Health. 2010;7(10):3657–3703.

Dunn G, Bakker K, Harris L. Drinking Water Quality Guidelines across Canadian Provinces and Territories: Jurisdictional Variation in the Context of Decentralized Water Governance. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(5):4634-4651.

Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 2012;3(2):71-87.

Médigue C, Rouxel T, Vigier P, Hénaut A, Danchin A. Danchin, A. Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. J Mol Biol. 1991;222(4):851-6.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1):142-201.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013;26(4):822-80.

Shetty VA, Kumar SH, Shetty AK, Karunasagar I, Karunasagar I. Prevalence and characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. J Lab Physicians. 2012;4(1):24-9.

Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesion on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(20):7839–7843.

Kaper JB. Defining EPEC. Rev Microbiol. 1996;27(1):130-133.

- Andrade FB, Gomes TAT, Elias WP. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. J Microbiol Methods. 2014;106:16-18.
- Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;66(3):281-98.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. J Clin Microbiol. 1998;36(2):598–602.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22^a edição. Washington: APHA; 2012.
- Schuroff PA, Burgos TN, Lima NR, Lopes AM, Pelayo JS. Phenotypic and genotypic characterization of potentially pathogenic *Escherichia coli* from water treatment plants. Arq Ciênc Saúde. 2014;21(3):93-8.
- Lascowski KMS, Guth BEC, Martins FH, Rocha SPD, Irino K, Pelayo JS. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. J Appl Microbiol. 2012; 14(4):1230-1239.
- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. J Clin Microbiol. 1995;33(5):1375-1377.
- Lima IF, Boisen N, Quetz Jda S, Havt A, de Carvalho EB, Soares AM, Lima NL, Mota RM, Nataro JP, Guerrant RL, Lima AA. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. J Med Microbiol. 2013;62(5):683-93.
- Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2006;61(5):1267–82.
- Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1995; 33(3):701-5.
- Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999;67(6):2692–2699.
- Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5849-5853.

Schultsz C, Pool GJ, Van Ketel R, de Wever B, Speelman P, Dankert J. Detection of ETEC in stool samples by using non- radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J Clin Microbiol. 1994;32(10):2393-7.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiol.* 1979; 3:95-99.

Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(5):687-90.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA, USA; 2016.

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013;5(1):58-65.

Navarro A, Eslava-Campos CA, Melendez-Herrada E, Cravioto A. *Escherichia coli* derived from different sources share antigenic characteristics with *Shigella boydii* 18 and virulence factors with enterotoxigenic *E. coli*. *Int J Adv Res.* 2016;4(10):629–638.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 2011.

Scorsafava MA, Souza A, Stofer M, Nunes CA, Milanez TV. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(2):229-32.

Burgos TN, Schuroff PA, Lopes AM, Lima NR, Pelayo JS. Água de consumo humano proveniente de poços rasos como fator de risco de doenças de veiculação hídrica. *Rev Ciênc Saúde.* 2014;16(1):34-38.

Matsuchita HLP, Schuroff PA, Lima NR, Burgos TN, Lopes AM, Pelayo JS. Qualidade bacteriológica da água de abastecimento público de Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) das cidades de Londrina, Cambé, Iporã e Rolândia, PR. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2014;13(1):60-63.

Amaral L, Filho NA, Junior ODR, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública.* 2003;37(4):510-4.

Patel CB, Vajpayee P, Singh G, Upadhyay RS, Shanker R. Contamination of potable water by enterotoxigenic *Escherichia coli*: qPCR based culture-free detection and quantification. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(8):2292–2298.

Barros EFS. Avaliação do saneamento ambiental em assentamentos de reforma agrária utilizando o método de análise hierárquica de processos [Dissertação]. Goiânia: Universidade

Federal de Goiás; 2013.

Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky ICA, Spano LC. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis*. 2013;13:418.

Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor HM, Gonzalez-Nuñez E, Velazquez-Roman J, Vidal JE, Muro-Amador S, Alapizco-Castro G, Díaz-Quiñonez JA, León-Sicairos N. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Front Microbiol*. 2016; 7:1924.

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 2016; 47(Suppl 1):3–30.

Cestari SE, Schuroff PA, Lima NR, Burgos TDN, Dambrozio AML, Pelayo JS. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. *Rer Ciênc Méd Biol*. 2016; 15(2):139-143.

Ram S, Vajpayee P, Singh RL, Shanker R. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72(2):490-5.

Kambire O, Adingra, AA, Yao KM, Koffi-Nevry R. Prevalence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes of *Escherichia coli* Isolates from Water, Sediment, Fish, and Crab in Aby Lagoon, Côte d'Ivoire. *Int J Microbiol*. 2017;1-8.

Poma V, Mamani N, Iñiguez V. Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. *SpringerPlus*. 2016; 5:499.

Ifeanyi CI, Ikeneche NF, Basse BE, Al-Gallas N, Ben Aissa R, Boudabous A. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(2):165-74.

Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin- 8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*. 1998;177(1):88-96.

Shah M, Kathiiko C, Wada A, Odoyo E, Bundi M, Miringu G, Guyo S, Karama M, Ichinose Y. Prevalence, seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya. *Trop Med Health*. 2016; 44:39.

Too JK, Sang WK, Ng'ang'a Z, Ngayo MO. Fecal contamination of drinking water in Kericho District, Western Kenya: role of source and household water handling and hygiene practices. *J Water Health*. 2016;14(4):662-71.

Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:254159.

Wingender J, Flemming HC. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int J Hyg Environ Health. 2011;214(6):417-23.

Batabyal P, Mookerjee S, Sur D, Palit A. Diarrheogenic *Escherichia coli* in potable water sources of West Bengal, India. Acta Trop. 2013;127(3):153– 157.

Pessanha RP, Gontijo Filho PP. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arq Bras Med Vet Zootec. 2001;53(1):111-115.

Von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling Å, Dougan G. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nat Genet. 2014;46(12):1321-6.

Araújo S. Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. Int J Food Microbiol. 2017; 257:192-200.

Gordon DM. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. EcoSal Plus. 2004;1(1).

Al-Khafaji NSK, Al-Thahab AAL. Phylogenetic Study of *Escherichia coli* Isolated from Clinical Samples in Hilla City, Iraq. J Pure Appl Microbio. 2017;11(4):1777-1781.

Kamruzzaman M, Shoma S, Bari SM, Ginn AN, Wiklendt AM, Partridge SR, Faruque SM, Iredell JR. Genetic diversity and antibiotic resistance in *Escherichia coli* from environmental Surface water in Dhaka City, Bangladesh. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76(2):222-6

Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. Environ Microbiol. 2007;9(9):2274–2288.

Nishimura LS, Ferreira LCS, Pacheco ABF, Guth BE. Relationship between outer membrane protein and lipopolysaccharide profiles and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. FEMS Microbiol Lett. 1996;143:253–258.

Wolf MK. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):569–584.

Rodas C, Mamani R, Blanco J, Blanco JE, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A, Iniguez V. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. Braz J Infect Dis. 2011;15(2):132-137.

Li Y, Luo Q, Shi X, Lin Y, Qiu Y, Lv D, Jiang Y, Chen Q, Jiang M, Ma H, Cheng J, Hu Q. Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Shenzhen, China. Foodborne Pathog Dis. 2017;14(6):333-340.

Benevides-Matos N, Pieri FA, Penatti M, Orlandi PP. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. *Braz J Microbiol.* 2015;46(1):131-137.

Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(6):545-52.

Dallman T, Smith GP, O'brien B, Chattaway MA, Finlay D, Grant KA, Jenkins C. Characterization of a Verocytotoxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Serogroup O111:H21 Strain Associated with a Household Outbreak in Northern Ireland. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4116–4119.