

Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreio gênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce

Molecular identification of diarrheagenic Escherichia coli in the watershed of Xopotó River, in Alto do Rio Doce, Brazil

Sheila Neves Drumond^{1*}, Aníbal da Fonseca Santiago²,
Mariana Moreira³, Maria Célia da Silva Lanna⁴, Hubert Mathias Peter Roeser⁵

RESUMO

Esta pesquisa científica teve como principal objetivo identificar patótipos de *Escherichia coli* diarreio gênica nas águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó, na região do Alto Rio Doce, Minas Gerais. Os estudos referentes às estirpes diarreio gênicas de *E. coli* no meio ambiente no Brasil são escassos. A bacia hidrográfica escolhida para o estudo sofre intensa degradação ambiental devido ao lançamento de esgoto *in natura* em seus corpos d'água e às atividades antrópicas, como a agropecuária. As coletas de água nos 13 pontos amostrais foram realizadas em duas épocas do ano de 2015 (abril e julho). Para identificação dos genes de *E. coli* diarreio gênica, utilizou-se o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). A bacia hidrográfica apresentou contaminação diarreio gênica de patótipos *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), tal ocorrência foi constante em ambas as campanhas. Os genes de virulência observados foram: na STEC, toxina Shiga (*Stx1*), responsável por causar doenças renais graves, como a síndrome hemolítico-urêmica (SHU); já a EPEC apresentou somente o gene virulento *eae*, característico do subgrupo atípico (aEPEC); a ETEC apresentou toxinas termolábeis (*LT*). A presença desses patótipos representa potencial risco de doenças diarreio gênicas na população que utiliza os recursos hídricos, particularmente idosos e crianças, e evidencia o comprometimento da qualidade microbiológica dos cursos d'água constituintes da Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó, decorrente principalmente da ausência de estações de tratamento de esgoto (ETEs).

Palavras-chave: Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó; Rio Doce; *Escherichia coli* diarreio gênica; reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

The main purpose of this scientific research was to identify pathotypes of diarrheogenic *Escherichia coli* in the watershed of Xopotó River, in Alto do Rio Doce, Minas Gerais region, Brazil. The studies referring to the stirps diarrheogenics of *E. coli* in the environment in Brazil are scarce. The watershed chosen for the study suffers intense environmental degradation due the release of raw sewage into their water bodies and human activities, such as agriculture. The water collecting at 13 sampling points were held in two periods of the year 2015 (April and July). For the identification of the genes of diarrheogenic *E. coli*, the method of reaction polymerase chain (PCR) was used. The watershed presented pathogenic contamination of pathotypes Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) such a constant occurrence in both campaigns. The virulence genes observed were: STEC, Shiga toxin (*Stx1*), responsible for causing severe kidney disease as hemolytic-uremic syndrome (HUS). Besides that, EPEC presented only the virulent gene *eae*, characteristic of the atypical subgroup (aEPEC), as well as thermolabile toxins (*LT*). The presence of these pathotypes represents potential risk of diarrheagenic diseases in the population that uses the water resources, particularly the elderly and children, and demonstrates the commitment of the microbiological quality of constituents watercourses of the watershed of Xopotó River, mainly because the lack of sewage treatment facilities.

Keywords: watershed of Xopotó River; Doce River; diarrheagenic *Escherichia coli*; polymerase chain reaction.

¹Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto (MG), Brasil.

²Universidade Federal de Viçosa - Viçosa (MG), Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

⁵Technische Universität Clausthal Zellerfeld - Clausthal-Zellerfeld, Alemanha.

*Autor correspondente: sheilandrums@gmail.com

Recebido: 24/06/2016 - Aceito: 23/03/2017 - Reg. ABES: 165696

INTRODUÇÃO

A degradação dos recursos hídricos superficiais ocorre principalmente em função das atividades antrópicas desenvolvidas no âmbito das bacias hidrográficas. As interferências dessas atividades nos recursos hídricos podem ser mensuradas utilizando, entre outros, os parâmetros microbiológicos. Para investigar a qualidade microbiológica da água, são utilizados os micro-organismos indicadores de contaminação fecal, denominados como grupo de coliformes, segundo a American Public Health Association (APHA, 2012), composto por coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e enterococci.

Segundo Barrell *et al.* (2002), para que uma bactéria seja considerada ideal como indicador de contaminação fecal, ela deve essencialmente estar presente em grande concentração nas fezes de humanos e de outros animais homeotérmicos, ser identificável por métodos simples, não crescer em águas naturais. Também deve estar presente em efluentes residuais, além de ser exclusivamente de origem fecal. Contudo, nenhuma bactéria indicadora preenche integralmente os requisitos, mas a *E. coli* possui significativa relevância. Esse micro-organismo é o único indicador de contaminação fecal na água e em alimentos relacionados exclusivamente com vestígios de fezes, assim como indica contaminação fecal recente em corpos d'água e pode ser detectada com baixo orçamento (WHO, 2011). Sua detecção é um indicativo da possível presença de outros patógenos causadores de doenças, como *Shigella*, *Salmonella*, vírus e protozoários.

A presença da bactéria no meio aquático está estreitamente relacionada a lançamentos de esgoto doméstico *in natura* nos corpos dos cursos d'água ou ao carreamento de partículas de solos expostos a fezes de animais. Em alimentos, especialmente os vegetais e as frutas, a contaminação por *E. coli* ocorre principalmente pela irrigação por essas águas e/ou pelo contato com excrementos animais (manejo errôneo de biofertilizantes).

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, cuja espécie mais pesquisada mundialmente é a *E. coli*, devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças entéricas. É uma bactéria gram-negativa, presente no trato intestinal de animais homeotérmicos, entre eles, o ser humano. É comensal, já que habita o intestino sem causar doenças. Apenas uma pequena parte das estirpes apresenta patogenicidade responsável por enfermidades, sendo seis os patótipos (grupos que apresentam diferentes mecanismos de virulência) de *E. coli* diarreio gênica que causam uma variedade de tipos de doenças, como, por exemplo, a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (KUHNER *et al.*, 2000).

Este estudo abordou as estirpes diarreio gênicas *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). A *E. coli* diarreio gênica possui grupos relevantes, pela importância clínica devido à produção de enterotoxinas semelhantes às da *Shigella dysenteriae* 1, como a STEC, que em casos mais severos progride para colites hemorrágicas e SHU, podendo levar a óbito. É também considerada como um patógeno alimentar emergente com

sintomas severos (SCHLENKER & SURAWICZ, 2009). Esse patótipo não possui limites estabelecidos pela legislação brasileira para alimentos e contato com corpos d'água e sua utilização.

Para Caldorin *et al.* (2013), mesmo que a ocorrência de doenças diarreicas em humanos no Brasil seja discreta, diversos estudos nacionais em rebanhos bovinos evidenciam a prevalência de cepas de STEC no país. Para a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), o crescente aumento dos surtos diarreicos relacionados com a STEC no mundo corrobora para demonstrar a importância da obtenção de dados da estirpe, principalmente devido ao fato de o Brasil fazer divisa com a Argentina, onde a STEC/EHEC é endêmica. Além do fato de a característica de contaminação, até então prioritariamente por ingestão de alimentos de origem animal, ter adquirido novo perfil, sendo que o último grande surto mundial de STEC foi por contaminação de vegetais por água de irrigação (WHO, 2011).

As STECs são um grupo de bactérias patogênicas emergentes, relacionadas a surtos diarreicos de origem alimentar. Entre os muitos subtipos que constitui o grupo, o mais comum é *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). Os sintomas causados pela STEC variam entre diarreia leve a colite hemorrágica e SHU, relacionada a sequelas renais (BRYAN *et al.*, 2015).

As cepas de STEC produzem importantes substâncias denominadas toxinas de Shiga (*Stx*), mais precisamente, *Stx1* e *Stx2*, seus principais fatores de virulência. A EHEC expressa simultaneamente os genes *Stx* e *eae*, principal diferença entre esse e os demais subtipos da STEC (LOUKIADIS *et al.*, 2006). A intimina (*eae*) confere maior severidade à diarreia causada pela EHEC, provocando com maior frequência a SHU (PATON & PATON, 1998). Para Persson *et al.* (2007), a evolução de doença diarreica para SHU tem sido relacionada com maior incidência em pessoas que apresentaram nas fezes a estirpe STEC contendo apenas a toxina *Stx2*.

A transmissão de STEC em humanos ocorre principalmente por via fecal oral, devido à ingestão de alimentos de origem animal contaminados, como carne bovina malcozida, derivados lácteos não pasteurizados, verduras e frutas irrigadas com água infectada, assim como por meio da ingestão direta de água contaminada com excrementos de animais. Os bovinos, saudáveis ou não, são o reservatório natural do patótipo com maior associação às enfermidades diarreicas humanas. A infecção também pode ser transmitida por contato interpessoal entre pessoas doentes e saudáveis, devido à falta de higiene (MEAD & GRIFFIN, 1998).

A EHEC foi relacionada com surtos diarreicos inicialmente em 1982 nos Estados de Óregon e Michigan, nos Estados Unidos. Wells *et al.* (1983), associaram a ingestão de hambúrguer com dor abdominal intensa e diarreia sanguinolenta (colite hemorrágica) com ausência ou presença de febre. Em 1983, pacientes apresentando quadro de SHU relataram diarreia de 4 a 10 dias antes da SHU (KARMALI *et al.*, 1983).

Para Nataro & Kaper (1998), estirpes patogênicas de *E. coli* são os principais causadores de diarreia infantil no mundo. Recentemente, a STEC foi relacionada com um surto diarreico em vários países da Europa e da América do Norte, por meio do qual cerca de 4.074 pessoas foram diagnosticadas com a infecção causada pelo patótipo associado à SHU. Somente na Alemanha, segundo a WHO (WHO, 2011), foram notificadas 3.935 internações, sendo que dos 857 casos de SHU, 32 pacientes evoluíram para óbito, e dos 3.078 casos de STEC/EHEC, foram contabilizadas 16 mortes. O consumo de vegetais crus irrigados com água contaminada foi apontado como causa do surto.

No Brasil, até o momento, não houve surtos diarreicos expressivos correlacionados com a estirpe EHEC (GUTH *et al.*, 2002). No entanto, segundo Irino *et al.* (2002), dois casos de diarreia sanguinolenta originados da ingestão de carne bovina malcozida foram relatados em 2001 na cidade de Campinas, São Paulo. Não houve progressão para SHU, mas as estirpes virulentas foram detectadas como EHEC. Para os mesmos autores, o primeiro caso notificado no país de diarreia relacionada com EHEC ocorreu em 1990, em São Paulo. No Laboratório Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram isoladas cepas de EHEC de um paciente diarreico de 18 anos com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS).

Outro grupo importante de *E. coli* diarréiogênica é a ETEC, que, devido à sua importância epidemiológica, afeta milhões de pessoas anualmente. Segundo Murray *et al.* (2009), a ETEC é endêmica dos países em desenvolvimento do continente americano, sendo que ocorrem cerca de 650 milhões de casos por ano de episódios diarreicos relacionados à estirpe, principalmente em crianças e viajantes. Segundo Nataro & Kaper (1998), água e alimentos infectados por fezes contaminadas com ETEC provocam os seguintes sintomas: diarreia com curto período de incubação, aquosa, sem sangue ou muco. A estirpe ETEC produz a enterotoxina *LT* (toxina termolábil), dividida em dois sorogrupos: *elt-Ia*, cuja patogenicidade atinge seres humanos e animais; e *elt-IIa*, predominantemente relacionada com diarreias em animais. As toxinas termolábeis são similares à enterotoxina do *Vibrio cholerae*. Outro grupo de enterotoxina associada à ETEC é composto pelas toxinas termoestáveis *S*, subdivididas em *Sta* e *Stb*, ambas relacionadas a doenças diarreicas tanto em humanos quanto em suínos; no entanto, a toxina *Stb* tem sido isolada principalmente em suínos (NATARO & KAPER, 1998). Segundo Sears & Kaper (1996), a estirpe está relacionada com diarreias em crianças nos países em desenvolvimento e em viajantes de países de primeiro mundo que visitam países subdesenvolvidos. Para Nataro e Kaper (1998), em regiões subdesenvolvidas a infraestrutura deficiente é responsável pela disseminação das doenças diarreicas associadas à ETEC.

A EPEC também é um importante patótipo relacionado a doenças entéricas nos países em desenvolvimento. As doenças diarreicas causadas pela estirpe EPEC, segundo Nataro & Kaper (1998), acometem principalmente crianças menores de dois anos em países subdesenvolvidos.

A principal via de contaminação é a feco-oral (mãos), após contato com água, alimentos e objetos de uso pessoal (fômites) contaminados por fezes. Os sintomas da infecção são: diarreia líquida aguda, com muco, febre e desidratação — em casos severos, pode ser prolongada (NATARO & KAPER, 1998).

No Brasil, assim como em outros países em que a infraestrutura de saneamento básico é insuficiente, as infecções por EPEC são recorrentes. Gomes *et al.* (1991) associaram 26% dos casos de diarreia infantil em menores de 12 meses no Estado de São Paulo a cepas de EPEC. Kobayashi *et al.* (2000) identificaram 18% das estirpes diarréiogênicas em crianças no Estado do Paraná como sendo EPEC.

Em 2012, doenças diarreicas mataram cerca de 1,5 milhão de pessoas em todo o mundo, segundo a WHO (2014). Tal agência ainda relatou que a diarreia foi a terceira causa de mortes em países de baixa renda, sendo responsável por 53% dos óbitos. Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, 2009), doenças diarreicas compõem a segunda causa de mortes em menores de 5 anos, matando 1,5 milhão de crianças anualmente. Para o mesmo órgão, o saneamento básico precário, a má qualidade da água de abastecimento e a falta de higiene são responsáveis por 88% das mortes por diarreia no mundo. Segundo o relatório do Trata Brasil (2010), o saneamento precário, principalmente o esgoto, reflete em quatro vezes mais internações por doenças diarreicas no Brasil.

Apesar da importância da identificação de estirpes diarréiogênicas de *E. coli* no meio ambiente, no Brasil, tais estudos são escassos. Citam-se como exemplo Schuroff *et al.* (2014), que estudaram a presença de EPEC e EHEC em Londrina, Paraná, e Célico *et al.* (2014), que observaram virulência de *E. coli* em água para irrigação.

Nesse contexto, no presente estudo objetivou-se avaliar quantitativamente os organismos indicadores de contaminação fecal (*E. coli*) e identificar molecularmente os tipos de virulências de EPEC, STEC/EHEC e ETEC presentes na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó em duas épocas sazonais no ano de 2015. A Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó está inserida nas nascentes da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, que apresenta importância econômica e social nos Estados de Minas Gerais e do Espírito Santo; no entanto, os municípios ao longo do Rio Xopotó possuem saneamento básico precário, com ausência, em sua maioria, de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e estações de tratamento de água (ETAs) em menor quantidade, potencializando o risco de contaminação da população por patógenos entéricos.

METODOLOGIA

Área de estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó está situada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, inserida na Unidade de Planejamento de Gestão

de Recursos Hídricos — UPRH DO1 Piranga (IGAM, 2015), pertencente à Bacia Hidrográfica do Rio Doce no âmbito federal, como ilustrado na Figura 1. A já citada bacia hidrográfica abrange 14 municípios: Alto Rio Doce, Brás Pires, Cipotânea, Desterro do Melo, Divinésia, Dorés do Turvo, Mercês, Paula Cândido, Presidente Bernardes, Rio Espera, Senador Firmino, Senhora de Oliveira, Senhora dos Remédios e Ubá.

Nesses municípios residem 189.987 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), sendo que a população rural se sobrepõe à urbana em 8 municípios. A Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó tem área igual a 2.068,16 km² e perímetro de 289,65 km, e o Rio Xopotó tem comprimento igual a 104,29 km. Na área de drenagem da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, o Rio Xopotó possui 3,27% de representatividade, com relação à vazão total do Rio Doce, e contribui com 34,7% m³/s (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV, 2016).

A disposição dos resíduos sólidos urbanos (RSU) dos municípios pertencentes à bacia hidrográfica no ano de 2015 não atendeu ao programa Minas Sem Lixões, da Fundação Estadual de Minas Gerais (FEAM), iniciado em 2003, que busca eliminar os descartes de RSU em mecanismos ambientalmente incorretos, como os lixões.

Segundo a FEAM (2015b), das 14 cidades, 3 descartaram seus resíduos em lixões, 6 possuíam unidades de triagem e compostagem (UTCs) regularizadas, 2 apresentam aterros controlados (ACs), 1 cidade possuía aterro sanitário (AS) regularizado, 2 cidades possuíam ASs não regularizados.

Entre os 14 municípios, apenas os municípios de Desterro do Melo e Senhora de Oliveira possuem ETEs instaladas e operando. Segundo a FEAM (2015), a estação de Desterro do Melo atende a cerca de 61% da população residente no município, e em Senhora de Oliveira a ETE atende a 90% da comunidade. As demais localidades lançam os efluentes *in natura* nos cursos d'água, diretamente no Rio Xopotó ou em seus afluentes.

O abastecimento de água em nove dos municípios da bacia hidrográfica é realizado por concessionária terceirizada, Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), e em quatro municípios, pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE). A cidade de Senhora dos Remédios não tem tratamento de água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Previamente, foram estabelecidos 13 pontos de amostragem de água para determinar a presença de *E. coli* na bacia hidrográfica, como evidenciado na Figura 2.

Os pontos de amostragem foram determinados após observação dos principais afluentes e núcleos populacionais inseridos no território Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó. As amostragens ocorreram em dois períodos anuais de 2015 representativos da estação chuvosa e seca (abril e julho). A confirmação da presença de *E. coli* foi realizada com substrato enzimático método Colilert® 9223B de acordo com APHA (2012). A identificação dos patótipos diarrreiogênicos de

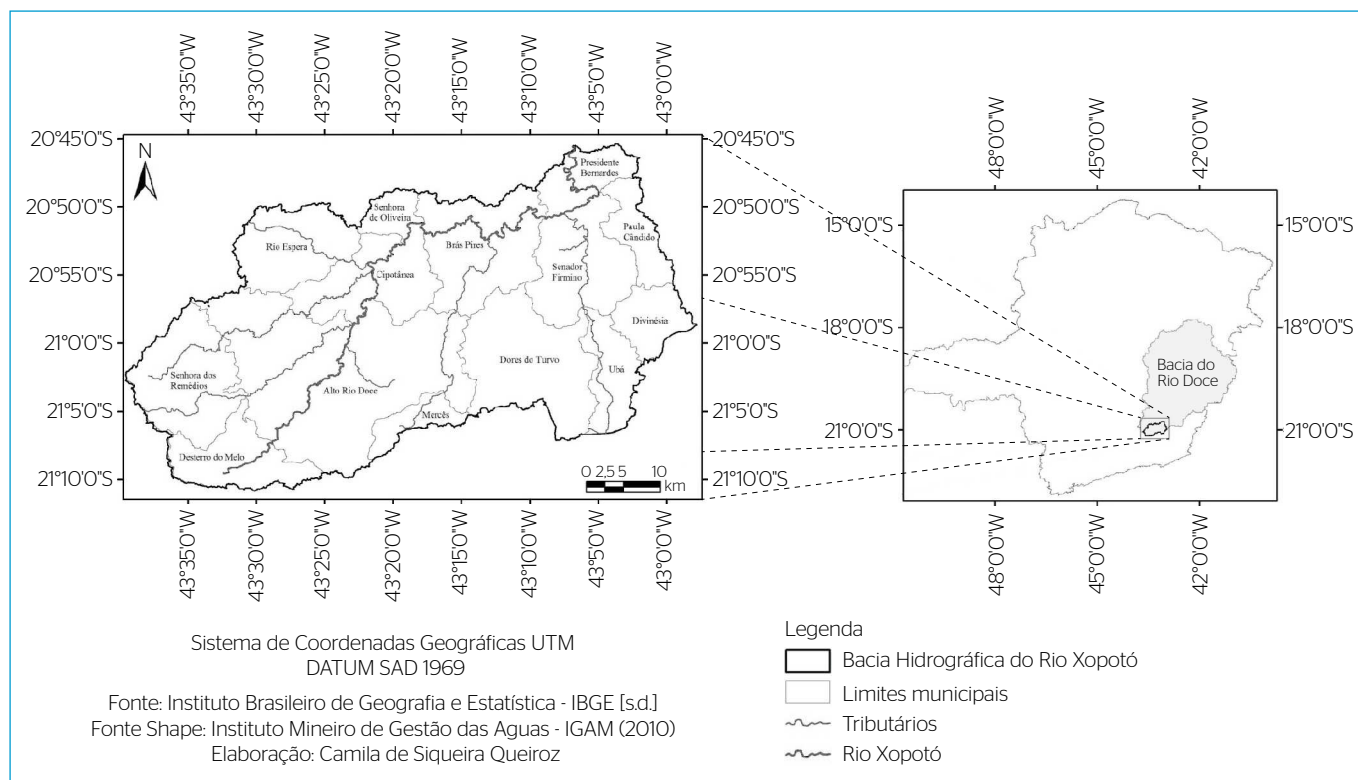


Figura 1 - Localização da bacia hidrográfica do Rio Xopotó.

E. coli foi orientada por literatura específica, como evidenciado no Quadro 1, sendo a análise qualitativa realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para isolamento e confirmação da identificação de *E. coli*, foi empregada a metodologia convencional, descrita a seguir:

- 1ª etapa: enriquecimento da amostra: uma alíquota de 10 µL das amostras de água cultivadas no substrato enzimático Colilert positivas para *E. coli* foi inoculada em Ágar MacConkey (MCK, HiMedia, Mumbai, Índia). A cultura foi incubada a 37°C, por 24 horas. De cada placa representativa de cada ponto foram pescadas todas as colônias com morfotipos diferentes e, no máximo, cinco colônias com o mesmo morfotipo. Cada uma delas foi inoculada em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Sparks, MD, EUA) e incubada;
- 2ª etapa: identificação das amostras isoladas: a identificação da espécie *E. coli*, em cada cultura pura, foi confirmada por provas bioquímico-fisiológicas: produção de gás a partir da glicose, fermentação

da lactose, descarboxilação da lisina, produção de indol a partir do triptofano, não utilização do citrato, não degradação da ureia e ausência de produção de sulfeto de hidrogênio a partir de aminoácidos sulfurados, utilizando o meio de Rugai modificado por Pessoa & Silva (1972).

Identificação molecular dos patótipos diarréiogênicos de *E. coli*

A extração de DNA das culturas puras de *E. coli* foi realizada por aquecimento. Inicialmente, as suspensões de colônias crescidas foram solubilizadas em 50 µL de água estéril Milli-Q® (Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França) e submetidas à fervura, em banho-maria, a 95°C, por 10 minutos; posteriormente, ocorreu a centrifugação do material com rotação 3.000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga.

A partir do sobrenadante foi medida a concentração de DNA em espectrofotômetro (Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA), empregando-se comprimento de onda de

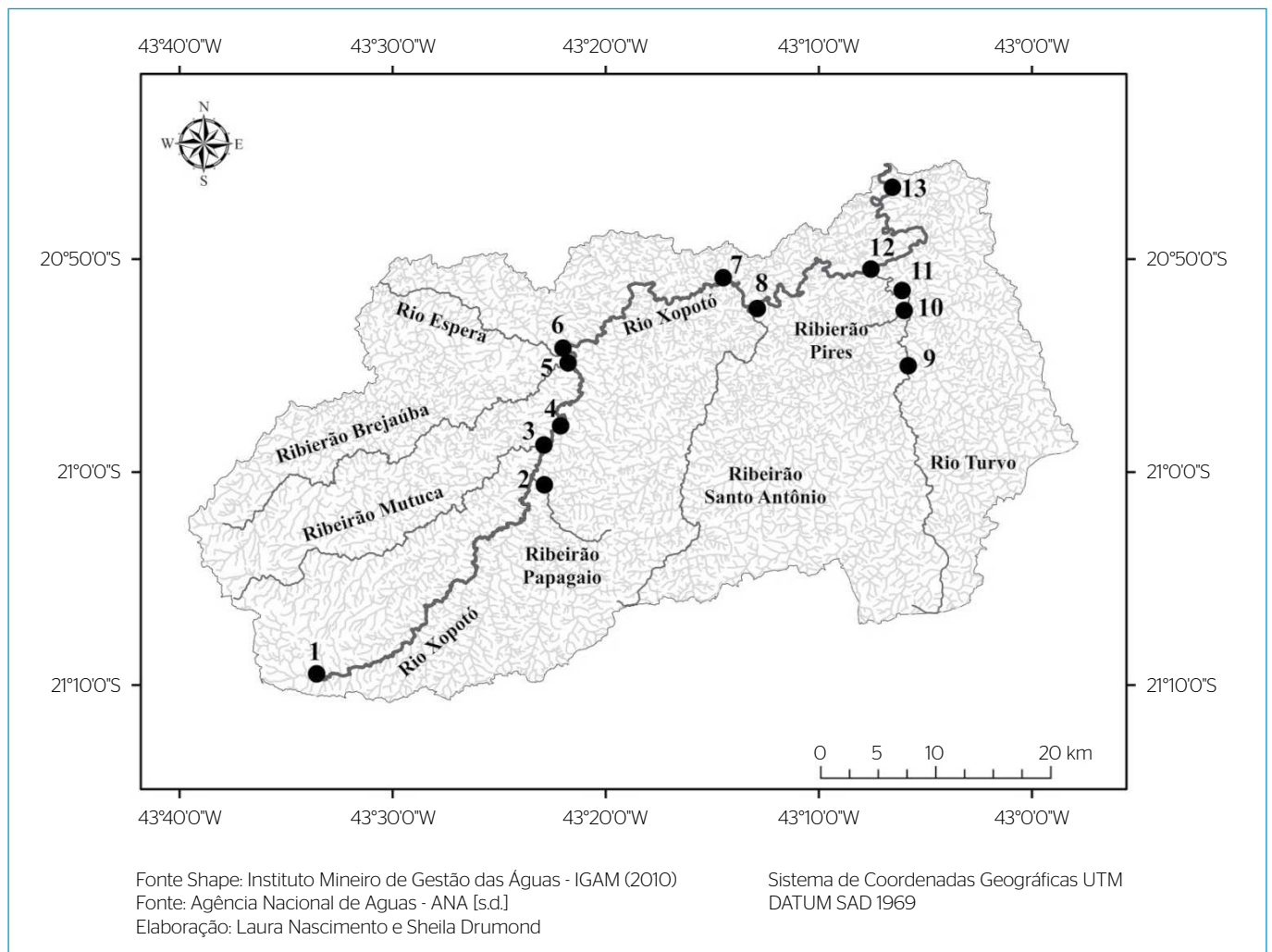


Figura 2 - Pontos de coleta na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó.

260 nm, e a relação DNA/proteína foi estimada utilizando-se, também, a leitura realizada a 280 nm. O material foi, então, mantido a -20°C até o momento de sua utilização.

As amostras de *E. coli* isoladas foram caracterizadas por meio de PCR, empregando-se como alvos os seguintes marcadores de virulência: *eae* (Reid et al., 1999), *bfpA* (GUNZBURG et al., 1995), *Stx1* e *Stx2* (VIDAL et al., 2004), *elt* e *est* (ARANDA et al., 2004). As reações de amplificação apresentam volume final de 20 µL e o *mix* é constituído por tampão (Tris HCl 10 mM, pH 8,4; KCl 25 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Promega), 0,5 µM de cada *primer* (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EUA), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Phonutria) e 20 ng de DNA molde. Os *primers* e as condições de cada reação estão apresentados no Quadro 1. Cerca de 4 µL dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 8% (Sigma-Aldrich) acrescido de 0,01% de corante SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os controles positivos para *eae*, *Stx1* e *Stx2* (*E. coli* CDC EDL-933, INCQS 00171), *bfpA* (*E. coli* CDC O126, INCQS 000184), *elt* (*E. coli* 0761-2), *est* (*E. coli* 0122-4), bem como o

controle negativo interno (água), foram incluídos em cada lote de reações. Para visualização das bandas da PCR no transluminador sob luz ultravioleta, foi confeccionado o gel de agarose 1,5%. Como padrão, foi utilizado o marcador de massa molecular 100 bp (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escherichia coli

Os resultados das análises microbiológicas realizadas em 2015 na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó constataram ocorrência de *E. coli* em todos os pontos de amostragem, confirmando a contaminação fecal e evidenciando a elevada possibilidade de presença de patógenos entéricos, como pode ser observado na Figura 3. Seis pontos na primeira coleta apresentaram concentrações de *E. coli* acima do estabelecido no Brasil (2005) de 1.000 NMP/100 mL para águas classe 2 (pontos 02, 06, 07, 08 e 13). Na segunda campanha de

Quadro 1 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores e peso molecular em pares de bases (utilizados nas reações em cadeia da polimerase).

Gene	Primer	Programa	Amplicon (bp)	Referência
<i>eae</i>	F: 5' CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA 3' R: 5' CCA GAC GAT ACG ATC CAG 3'	95°C/40 s 53°C/2 min 60°C/2 min 40x	917	Reid et al. (1999)
<i>bfpA</i>	F: 5' AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC 3' R: 5' GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA 3'	95°C/40 s 53°C/2 min 60°C/2 min 40x	326	Gunzburg et al. (1995)
<i>tx1</i>	F: 5' CAG TTA ATG TGG TGG GGA AGG 3' R: 5' CCA CAG ACA ATG TAA CCG CTG 3'	95°C/20 s 61°C/40 s 72°C/90 s 30x	348	Vidal et al. (2004)
<i>tx2</i>	F: 5' ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G 3' R: 5' GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAC C 3'	95°C/20 s 61°C/40 s 72°C/90 s 30x	584	Vidal et al. (2004)
<i>elt</i>	F: 5' GGC GAG AGA TTA TAC CGT GC 3' R: 5' CGG TCT CTA TAT TCC CCT GTT 3'	95°C/5 min 95°C/45 s 50°C/1 min 72°C/1 min 40x 72°C/7 min	820	Aranda et al. (2004)
<i>est</i>	F: 5' AAA GGA GAG CTT CGT CAC ATT TT 3' R: 5' AAT GTC CGT CCT GCT TTA GGA C 3'	95°C/5 min 95°C/45 s 50°C/1 min 72°C/1 min 40x 72°C/7 min	190	Aranda et al. (2004)

Fonte: Reid et al. (1999), Vidal et al. (2004) e Aranda et al. (2004).

coleta, devido à redução da precipitação na área de estudo, a concentração de *E. coli* diminuiu consideravelmente — o ponto 06 foi o único que apresentou concentrações em desacordo com a legislação nessa amostragem.

A concentração de *E. coli* no ponto 07, detectada na primeira coleta ($12,74 \times 10^3$ NMP/100 mL), foi a mais elevada de ambas as coletas na bacia hidrográfica. As águas desse e dos demais pontos amostrais, como se encontram, apresentam restrições quanto ao uso para irrigação de hortaliças e frutas, bem como para piscicultura e des-sedentação de animais, segundo critérios estabelecidos pela legislação do Brasil (2005). Para ETAs que captam águas desses pontos ou nas adjacências, a adição de cloro para desinfecção deve ser realizada com mais atenção.

Escherichia coli diarréiogênica

Dos 13 pontos analisados nas 2 campanhas de amostragem (26 amostras), foram isoladas 103 colônias positivas para *E. coli*. Das amostras positivas, uma apresentou genes de virulência característicos do patótipo ETEC, duas foram detectadas como genes *Stx1* ou *Stx2* presentes na linhagem da EHEC/STEC e outras três pertenciam à linhagem EPEC.

Akter *et al.* (2013), analisando 46 rios na República Popular Bangladesh, observaram a prevalência das estirpes de ETEC, STEC e EPEC nos cursos d'água no país, corroborando a premissa de que eles são os patótipos mais recorrentes na contaminação microbológica de águas superficiais por todo o mundo. Em estudo realizado em águas superficiais no Estado de Osun, sudoeste da Nigéria, Titalawo *et al.* (2015) observaram que em 300 colônias isoladas em 10 pontos

amostrais, cerca de 91% apresentavam genes de virulência relacionados a algum patótipo de *E. coli*; sendo assim, apenas 9% das colônias não apresentavam risco à saúde humana ou animal, confirmando a alta proporção da contaminação microbológica na área de estudo. Nesse estudo na Nigéria, aproximadamente 45% das amostras eram da estirpe ETEC, seguida pela EHEC e pela EPEC. Situação diferente da Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó, na qual as estirpes STEC e EPEC foram as mais representativas, detectadas em três pontos na área de estudo. Já a ETEC apareceu em um ponto amostral.

Na primeira campanha amostral, em época de maior índice pluviométrico, 3 dos 13 pontos analisados foram diagnosticados com genes patogênicos de *E. coli*, sendo eles: 01 (ETEC), 06 (EPEC) e 10 (EPEC). Na segunda coleta, realizada em período de menor pluviosidade, os pontos 02 (STEC), 06 (STEC) e 12 (EPEC) apresentaram bactérias diarréiogênicas.

O ponto de coleta 01, na primeira campanha amostral, apresentou concentrações abaixo do exigido (BRASIL, 2005): $9,9 \times 10^1$ NMP/100 mL; no entanto, foi detectada estirpe diarréiogênica de ETEC no local e a dose infectante do patógeno é alta, sendo necessários cerca de 10^8 de organismos para causar infecções (NATARO & KAPER, 1998), sendo assim, diante da concentração total de *E. coli* no ponto amostral, a possibilidade de contaminação parece ser reduzida. No ponto de coleta 02, a concentração de *E. coli* na primeira amostragem estava acima do limite aceitável ($1,48 \times 10^3$ NMP/100 mL), nenhuma estirpe diarréiogênica foi detectada; na segunda coleta, a concentração de *E. coli* diminuiu em torno de 7 vezes (2×10^2 NMP/100 mL) e detectou-se o patótipo EHEC na amostragem.

No ponto amostral 05 a concentração de *E. coli* desobedeceu ao limite máximo estabelecido (BRASIL, 2005) na primeira coleta ($1,46 \times 10^3$ NMP/100 mL), campanha amostral na qual não foi detectada estirpe virulenta. Na segunda coleta, houve diminuição de *E. coli* ($4,1 \times 10^2$ NMP/100 mL), também sem detecção de patógenos. O ponto amostral 06 foi o único incidente em altas concentrações de *E. coli* nas duas campanhas amostrais, estando, por isso, em desacordo com a legislação ($9,9 \times 10^2$ e $5,548 \times 10^3$ NMP/100 mL, respectivamente). Na primeira campanha amostral detectou-se EPEC no local.

A estirpe EHEC possui baixa dose infectante, de 100 a 200 organismos podem causar infecção (NATARO & KAPER, 1998); diante da concentração de *E. coli* detectada no ponto amostral 06, as medidas de prevenção de contato e utilização desse corpo d'água devem ser intensificadas.

O ponto amostral 10 apresentou concentrações de *E. coli* dentro do exigido pela legislação em ambas as coletas ($7,4 \times 10^2$ e $2,0 \times 10^2$ NMP/100 mL). Somente na primeira campanha amostral detectou-se o patógeno EPEC. O ponto de amostragem 12 não excedeu o limite máximo de $1,0 \times 10^3$ NMP/100 mL estipulado (BRASIL, 2005), apresentando $4,1 \times 10^2$ e $2,0 \times 10^2$ NMP/100 mL, respectivamente. Na primeira coleta houve

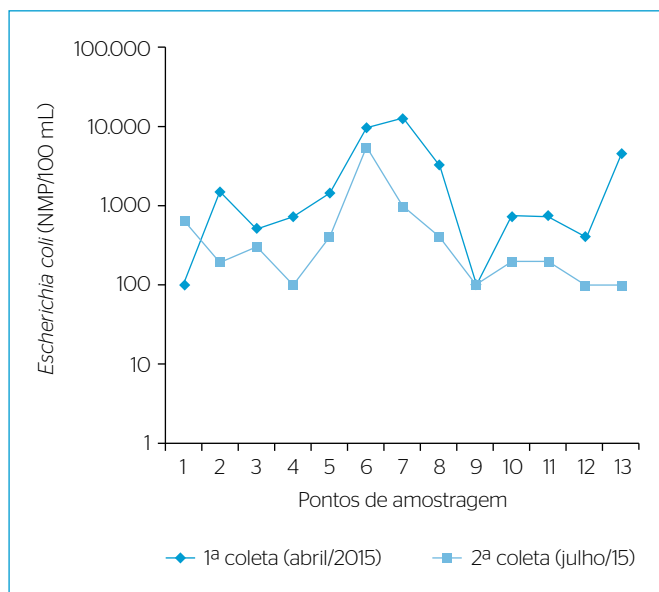


Figura 3 - Concentração de *Escherichia coli* em 2015.

deteção do patógeno EPEC, já na segunda amostragem não houve detecção de nenhuma estirpe diarreiogênica.

É possível observar a distribuição temporal e espacial dos patótipos diarreiogênicos na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó, no ano de 2015, na Figura 4.

A contaminação fecal da bacia hidrográfica foi proporcional à sazonalidade, devido principalmente à intensificação do escoamento superficial, acentuando o transporte de partículas contaminadas por material fecal para os corpos d'água. A sazonalidade foi descrita, por inúmeros autores, como a principal variável influenciadora na degradação da qualidade microbiológica das águas superficiais. Segundo Melo (2006), em estudo nas lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, os resultados de *E. coli* foram superiores nos meses de maior índice pluviométrico. Morais et al. (2012) destacam que no Rio Cabeça,

São Paulo, entre os meses de outubro a março, devido à maior incidência do escoamento superficial e à ausência de mata ciliar, a concentração da bactéria foi superior à da estação seca. Segundo Brennan et al. (2013), a capacidade de sobrevivência da *E. coli* devido a necessidades nutricionais simples e à adaptabilidade de versatilidade no interior do solo transforma o ambiente em um disseminador de contaminação microbiológica para corpos hídricos, potencializando a possibilidade de carreamento de patótipos diarreiogênicos.

Dos 5 pontos de amostragem positivos para bactérias diarreiogênicas, 3 estão localizados em áreas rurais com presença de atividade pecuária (06 e 12) e, em menor proporção, em locais nos quais há lançamento de esgoto doméstico *in natura* (01, 02 e 10). Sendo assim, o carreamento de partículas do solo contaminado é o principal meio de entrada das bactérias nos cursos d'água. Já o ponto amostral 12, também

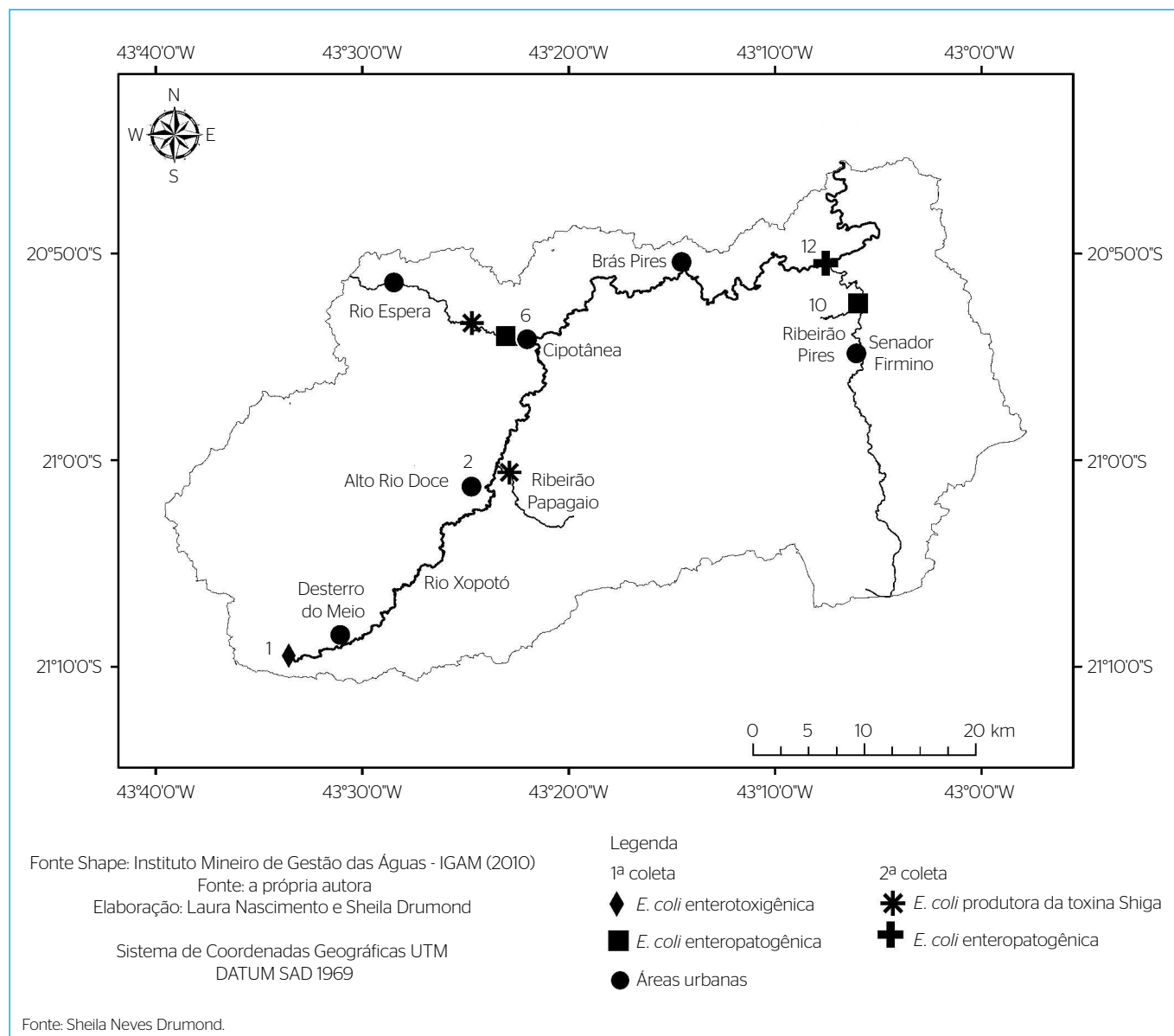


Figura 4 - Localização de *Escherichia coli* diarreiogênica na bacia hidrográfica em 2015.

situado em zona rural, além de receber contribuições da contaminação fecal proveniente da pecuária, recepciona considerável aporte de esgoto doméstico *in natura* dos núcleos populacionais a montante da bacia hidrográfica. A contaminação do outro ponto positivo para *E. coli* diarreiogênica (ponto 06) também foi motivada principalmente por lançamento de esgoto doméstico *in natura*, porém proveniente dos municípios de Rio Espera e Alto Rio Doce.

A estirpe diarreiogênica ETEC, identificada no ponto amostral 01, segundo Mainil (2013), possui como principais hospedeiros: seres humanos, bovinos, suínos e cachorros. Segundo Foster & Smith (2009), infecções diarreicas em bezerros são mais frequentemente associadas à estirpe ETEC. No Estado de Minas Gerais, Andrade *et al.* (2012) identificaram genes de virulência característicos do patótipo tanto em bezerros saudáveis quanto em animais diarreicos. Em estudo realizado com bezerros no Vale da Caxemira, na Índia, Manzoor *et al.* (2015) diagnosticaram a prevalência de ETEC em 15% dos em 200 animais analisados. Devido às características das atividades antrópicas desenvolvidas no ponto amostral em questão, possivelmente a contaminação foi originada das fezes de bovinos.

A STEC foi diagnosticada na segunda campanha amostral nos pontos de coleta 02 e 06, que apresentaram apenas o gene de virulência *Stx1*, semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* 1, causa de diarreia aguda. O lançamento de esgoto e a atividade pecuária podem ter sido preponderantes para a detecção.

A estirpe EPEC foi identificada em 2 pontos amostrais (06 e 10) na primeira campanha de coleta e em um ponto de coleta da segunda amostragem (12). Todos os pontos estão sob a influência da pecuária, mas salienta-se que o ponto 06 está localizado em área urbana e o ponto 12 em zona rural, ambos sob a interferência de esgoto doméstico *in natura*. Nos três pontos em que patótipo EPEC foi identificado, o gene virulento apresentou características atípicas, ou seja, a estirpe apresentou apenas o *eae* gene. Segundo Nguyen *et al.* (2006), em humanos infectados pela EPEC atípica, há aumento da possibilidade de óbito, devido ao prolongamento do estado diarreico.

Em comparação com estudos de identificação molecular de EPEC diarreiogênica em águas superficiais realizados no Brasil e no exterior, a Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó apresentou tendência similar de diagnóstico entre 2 e 3% de EPEC atípica nas pesquisas. Melo *et al.* (2006), estudando lagos de Minas Gerais, diagnosticaram em 2,5% das cepas *eae* gene; Sidhu *et al.* (2013), analisando a qualidade microbiológica de rios na Austrália, concluíram que 3% das cepas diarreiogênicas eram de EPEC atípica; Schuroff *et al.* (2014), diagnosticaram 2% de *eae* gene em lagos no Paraná. Os fatos corroboram o aumento mundial das doenças diarreicas, cujo agente etiológico é a EPEC atípica, como diagnosticado por Blanco *et al.* (2006), em Montevidéu, no Uruguai, e Kozub-Witkowski *et al.* (2008), na Alemanha.

A contaminação de alimentos em regiões com potencial de produção de leguminosas e culturas olerícolas, como hortaliças e frutas,

semelhante à área de estudo, ocorre principalmente devido à má qualidade da água de irrigação. A área de estudo, segundo dados do IBGE (2015), produziu, no ano de 2014, 13 t de tomate, além de hortaliças de subsistência, conforme observado em campo.

A população que vive na área da Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó utiliza os recursos hídricos locais para diversos fins. A confirmação de elevados índices de concentração de *E. coli* em todos os pontos de coleta, independentemente da sazonalidade, e a verificação de estirpes diarreiogênicas altamente infecciosas, como o gene *Stx* da STEC, comprovam o elevado risco de contaminação na área de estudo. Para Ndlovu *et al.* (2015), a presença do gene *Stx* em águas superficiais é grave, devido principalmente aos múltiplos usos do recurso em uma bacia hidrográfica e à facilidade de acesso pelo ser humano. A severidade das doenças diarreicas causadas pela *E. coli* que apresenta tal gene pode levar a óbito ou a sequelas renais irreversíveis, o que potencializa a gravidade de sua identificação na área de estudo.

Segundo Cerqueira *et al.* (1999), a detecção de ETEC e STEC em regiões onde a pecuária leiteira é significativa, como a estudada, torna explícita a necessidade da precaução higiênico-sanitária dos trabalhadores no manuseio do gado na ordenha, na preparação de derivados do leite e na utilização de esterco bovino na adubação de alimentos, principalmente os ingeridos. O reconhecimento da bactéria EPEC, causa de grande parte das internações por gastroenterites, em sua forma atípica, ainda pouco estudada e sem definição certa das consequências para doenças diarreicas humanas, é motivo para cautela nos usos dos recursos hídricos locais, já que, segundo Sidhu *et al.* (2013), há uma tendência de ascensão do *eae* gene em águas superficiais. Ainda, deve existir prudência no ambiente hospitalar regional, já que a disseminação pode ocorrer por contato pessoal, principalmente em Senhora dos Remédios, município da bacia hidrográfica que ainda não tem ETA.

CONCLUSÕES

A qualidade microbiológica da água na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó está em deterioração; além das elevadas concentrações detectadas de *E. coli* em 2015, a bacia hidrográfica apresentou, em ambas as amostragens, diversificados genótipos de *E. coli* diarreiogênica (STEC, EPEC e ETEC).

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora, ao Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos - LBTM, a Fundação Gorceix, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERÊNCIAS

- AKTER, S.; ISLAM, M.; AFREEN, K.S.; AZMUDA, N.; KHAN, S.I.; BIRKELAND, N.K. (2013) Prevalence and distribution of different diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulotypes in major water bodies in Bangladesh. *Epidemiology & Infection*, Reino Unido, v. 141, n. 12, p. 2516-2525. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000320>
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (2012) *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 22. ed. Washington, DC.: APHA.
- ANDRADE, G.I.; COURA, F.M.; SANTOS, E.L.; FERREIRA, M.G.; GALINARI, G.C.; FACURY FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. (2012) Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, Reino Unido, v. 44, n. 7, p. 1783-1790. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0139-8>
- ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. (2004) Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p.5849-5853.
- BARRELL, R.; BENTON, C.; BOYD, P.; CARTWRIGHT, R.; CHADA, C.; COLBOURNE, J.; COLE, S.; COLLEY, A.; DRURY, D.; GODFREE, A.; HUNTER, P.; LEE, J.; MACHRAY, P.; NICHOLS, G.; SARTORY, D.; SELLWOOD, J.; WATKINS, J. (2002) *The Microbiology of Drinking Water: Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*. Environment Agency. Parte 1.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; VARELA, G.; GADEA, M.P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. (2006) Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (B and R/2B). *Journal of Medical Microbiology*, Holanda, v. 55, n. 9, p. 1165-1174. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46518-0>
- BRASIL. (2005) Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a Classificação dos Corpos de água e Diretrizes Ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, p. 58-63.
- BRENNAN, F.P.; GRANT, J.; BOTTING, C.H.; O'FLAHERTY, V.; RICHARDS, K.G.; ABRAM, F. (2013) Insights into the low-temperature adaptation and nutritional flexibility of a soil-persistent *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Ecology*, v. 84, n. 1, p. 75-85. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12038>
- BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A.J. (2015) Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 35, n. 2, p. 247-272. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.02.004>
- CALDORIN, M.; ALMEIDA, I.A.Z.C. de; PERESI, J.T.M.; ALVES, E.C. (2013) Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 10, n. 110, p. 4-20.
- CÉLICO, A.S.; MENECHINE, A.K.; SARAN, L.M.; ALVES, L.M.C. (2014) Detecção de genes de virulência de *Escherichia coli* em amostras de águas para irrigação. *Ciência & Tecnologia*, Jaboticabal, v. 6, p. 6-10.
- CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. (1999) High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 70, p. 111-121.
- FOSTER, D.M.; SMITH, G.W. (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 25, n. 1, p. 13-36. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE (FEAM). *Minas sem Lixões*. 2003. Disponível em: <<http://www.feam.br/minas-sem-lixoes>>. Acesso em: 01 ago. 2015.
- _____. *Plano para Incremento do Percentual de Tratamento de Esgotos Sanitários da Bacia Hidrográfica do Rio Piranga: Volume II - Relatório por Município*. Belo Horizonte - MG: S.n, 2015. 402 p. Disponível em: <http://www.feam.br/images/stories/2016/MONITORAMENTO_EFLUENTES/Piranga/Anexo_2_-_PITE_Piranga_-_Volume_II_ParteI.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2015.
- _____. Secretaria do Estado de Meio Ambiente (Semad). (2015b) *Panorama da Destinação dos Resíduos Sólidos Urbanos no Estado de Minas Gerais em 2014*. Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.feam.br/images/stories/2015/MINAS_SEM_LIXOES/ARQUIVOS/relatorio-de-%20progresso-panorama-%20Orsu_2015_gerub_fpf.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2015.
- FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). (2009) *Diarrhoea: why children are still dying and what can be done*. Nova York: UNICEF. 68p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44174/1/9789241598415_eng.pdf>. Acesso em: 02 out. 2015.
- GOMES, T.A.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.; GUTH, B.E.; CANDEIAS, J.A.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.; BLAKE, P.A. (1991) Enteropathogens Associated with Acute Diarrheal Disease in Urban Infants in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, v. 164, n. 2, p. 331-337. <https://doi.org/10.1093/infdis/164.2.331>
- GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORT, N.G.; RILEY, L.W. (1995) Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1375-1377.
- GUTH, B.; RAMOS, S.; CERQUEIRA, A.; ANDRADE, J.; GOMES, T. (2002) Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p.1085-1089. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800003>
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). (2010) *IBGE Cidades*. MG. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=31&search=minas-gerais>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

- INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS (IGAM). (2015) *Bacia hidrográfica do Rio Doce*. 2015. Disponível em: <<http://www.igam.mg.gov.br/component/content/155?task=view>>. Acesso em: 26 nov. 2015.
- IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. (2002) O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 4, p.446-447.
- KARMALI, M.; STEELE, B.T.; PETRIC, M.; LIM, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools: Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, Inglaterra, v. 1, n. 8325, p. 619-620.
- KOBAYASHI, R.K.T.; SARIDAKIS, H.O.; DIAS, A.M.G.; VIDOTTO, M.C. (2000) Molecular identification of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 275-280. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000400007>
- KOZUB-WITKOWSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. (2008) Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 2, p. 403-410. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03545.x>
- KUHNERT, P.; BOERLIN P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 107-117, 2000.
- LOUKIADIS, E.; KÉROURÉDAN, M.; BEUTIN, L.; OSWALD, E.; BRUGÉRE, H. (2006) Characterization of Shiga Toxin Gene (stx)-Positive and Intimin Gene (eae)-Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 5, p. 3245-3251. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.5.3245-3251.2006>
- MAINIL, J. (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Holanda, v. 152, n. 1-2, p. 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
- MANZOOR, R.; SHAH, M.I.; UL-HUSNA, A.; WANI, S.A.; PANDIT, F.; DAR, P.A.; MIR, M.I. (2015) Prevalence, serodiversity and antibiogram of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in diarrhoeic calves and lambs of Kashmir valley (J&K), India. *Journal of Applied and Natural Science*, Índia, v. 7, n. 1, p. 477-481.
- MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. (1998) *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, Inglaterra, v. 352, n. 9135, p. 1207-1212.
- MELO, S.K. (2006) *Caracterização de fatores de virulência em amostras de Escherichia coli isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- MORAIS, E.B.; TAUK-TORNISIELO, S.M.; VENTORINI, S.E. (2012) Impactos das atividades agropecuárias na qualidade das águas do Rio Cabeça, na bacia do Rio Corumbataí-SP. *Holos Enviroment*, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 45-57. <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v12i1.4517>
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. (2009) *Microbiologia Médica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201.
- NDLOVU T, L.E.; ROUX, M.; KHAN, W.; KHAN, S. (2015) Co-Detection of Virulent *Escherichia coli* Genes in Surface Water Sources. *Plos One*, v. 10, n. 2, p. 0116808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116808>
- NGUYEN, R.N.; TAYLOR, L.S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R.M. (2006) Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection and Prolonged Diarrhea in Children. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 4, p. 597-603. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1204.051112>
- PATON, J.C.; PATON, A.W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479.
- PERSSON, S.; OLSEN, K.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. (2007) Subtyping Method for *Escherichia coli* Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 6, p. 2020-2024. <https://doi.org/10.1128/JCM.02591-06>
- PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. (1972) Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 32, p. 97-100.
- REID, S.D.; BETTING, D.J.; WHITTAM, T.S. (1999) Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, n. 8, p. 2719-2722.
- SCHLENKER, C.; SURAWICZ, C.M. (2009) Emerging infections of the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 23, n. 1, p. 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2008.11.014>
- SCHUROFF, P.A.; LIMA, N.R.; BURGOS, A.M.L.; LOPES, A.M.; PELAYO, J.S. (2014) Qualidade microbiológica da água do Lago Igapó de Londrina - PR e caracterização genotípica de fatores de virulência associados a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 35, n. 2, p. 11-20. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2014v35n2p11>
- SEARS, C.L.; KAPER, K.B. (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*, Bethesda, v. 60, n. 1, p. 167-215.
- SIDHU, J.P.S.; AHMED, W.; HODGERS, L.; TOZE, S. (2013) Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes in *Escherichia coli* Isolates from Surface Water. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 79, n. 1, p. 328-335. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02888-12>

TITILAWO, Y.; OBI, L.; OKOH, A. (2015) Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 1-14. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12866-015-0540-3>

TRATA BRASIL. (2010) *Esgotamento sanitário inadequado e impactos na saúde da população: um diagnóstico na situação nos 81 municípios brasileiros com mais de 300 mil habitantes*. Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA (UFV). (2016) *Atlas Digital das Águas de Minas*. Disponível em: <<http://www.atlasdasaguas.ufv.br/home.html>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. (2004) Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*,

Washington, v. 42, n. 4, p. 1787-1789. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.42.4.1787-1789.2004>

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.18, n.3, p.512-520.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*. 4. ed. Geneva: WHO Library.

_____. (2014) *The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

_____. (1998) *Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC)*. Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Geneva: WHO.

