

Mariana Moreira

Pesquisa de *Escherichia coli* diarreiogênica em pontos de abastecimento de água para consumo georreferenciados, na mesorregião de Belo Horizonte, como modelo inovador de ação em Vigilância Epidemiológica

**Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

Belo Horizonte

2018

Mariana Moreira

Pesquisa de *Escherichia coli* diarreiogênica em pontos de abastecimento de água para consumo georreferenciados, na mesorregião de Belo Horizonte, como modelo inovador de ação em Vigilância Epidemiológica

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Como um dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Maria Célia da Silva Lanna

Luiz de Macêdo Farias

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2018

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

Aos meus pais Elenita e Adelson,
Ao meu irmão Adelson Moreira, pelo apoio e compreensão.
Aos meus tios Aparecida e Domício
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que sempre me protege e me fortalece.

Agradeço a professora Maria Célia Lanna pelo companheirismo e amizade de todos estes anos, por confiar em mim para realizar este trabalho. Foram muitos encontros, muitas viagens e finalmente encerramos mais um trabalho.

Agradeço imensamente a Professora Paula Prazeres Magalhães e o Professor Luiz de Macedo por ter nos recebido de forma carinhosa e gentil em seu laboratório desde o primeiro momento que nos encontramos. Obrigada por ter aceitado nossa proposta, por sempre estar ajudando e pela forma que se dedica ao trabalho.

Agradeço a todos os alunos e professores do Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal de Minas Gerais, que se tornaram meus novos amigos, principalmente o João e a Patrícia que me ajudaram em alguns experimentos.

Agradeço também aos alunos e professores do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto onde realizei a maior parte da pesquisa. Agradeço principalmente a Leticia e a Deise.

Agradeço amizade e a parceria da Gislaine, por sempre me ajudar, por repassar sua experiência e pela disponibilidade.

Agradeço toda minha família (pais, irmãos, tios e tias, primos e primas) pela paciência por ajudar enfrentar os desafios, sempre estar do meu lado e confiar em mim.

Agradeço o meu amor Marcio Perdomo, melhor amigo e companheiro de todas as horas, pela força transmitida e pela paciência.

Agradeço aos meus amigos pelas verdadeiras amizades, e de modo especial agradeço ao Jusdon, Matelzinho, Gabriela, Wiviane, Elisa, Caio.

Aos meus amigos de trabalho Ademilde, Simone Cristina, Magda, Neusa, Fatinha, Freds, Carlão e todos os outros.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse finalizar este trabalho.

SUMÁRIO

1	Introdução	14
1.1	Normatização da qualidade da água e a saúde humana	14
1.2	Histórico da legislação brasileira relacionada à qualidade da água para o consumo humano	14
1.3	A qualidade da água nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento	17
1.4	A qualidade do abastecimento de água nos municípios brasileiros	20
1.5	Mudanças climáticas e ambientais e o agravamento de doenças infecciosas no Brasil	21
1.6	A captação e o fornecimento de água para consumo humano na mesorregião de Belo Horizonte: municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito	23
1.7	Localização geográfica da mesorregião de Belo Horizonte: municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito.	23
1.8	Geoprocessamento de dados para o fortalecimento da vigilância epidemiológica	24
1.9	A qualidade da água e os coliformes	25
1.10	Coliformes totais e <i>E. coli</i> : parâmetros normativos para a qualidade da água	26
1.11	Caracterização e diversidade genética de <i>E. coli</i>	27
1.11.1	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	30
1.11.2	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	31
1.11.3	<i>E. coli</i> produtora de toxina shiga (STEC) e enterohemorrágica (EHEC)	32

1.11.4	<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	33
1.11.5	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	34
1.11.6	<i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC)	35
2	Justificativa	36
3	Objetivos	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	Materiais e métodos	39
4.1	Obtenção das amostras de água	39
4.2	Análise microbiológica da potabilidade da água para o consumo: pesquisa de coliformes totais e <i>E. coli</i>	40
4.3	Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	41
4.4	Caracterização genotípica de patotipos diarreiogênicos de <i>E. coli</i>	41
4.5	Análise espacial dos pontos de água contaminada com <i>E. coli</i> nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito	43
5	Resultados e Discussão	44
5.1	Obtenção das amostras de água	44
5.2	Análise microbiológica da potabilidade da água para consumo: pesquisa de coliformes totais e <i>E. coli</i>	44
5.3	Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	51
5.4	Caracterização genotípica de patotipos diarreiogênicos de <i>E. coli</i>	51
5.5	Deteção de patógenos otimizada via vigilância ambiental dos municípios	56
5.6	Importância epidemiológica da abrangência da amostragem em áreas urbana rural	56
5.7	Análise espacial dos pontos de água contaminada com <i>E. coli</i> nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito	57

6	Conclusão	75
7	Revisão bibliográfica	77
8	Anexos	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características gerais dos patotipos diarreiogênicos de <i>Escherichia coli</i> .	29
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de localização dos municípios estudados (Ouro Preto, Mariana e Itabirito) e dos pontos de coleta das amostras de água.	39
Figura 2	Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	59
Figura 3	Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	60
Figura 4	Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	61
Figura 5	Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	62
Figura 6	Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas para <i>E. coli</i> diarreiogênica no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	63

Figura 7	Concentração das coletas de água positivas para <i>E. coli</i> diarreiogênica no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	64
Figura 8	Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	65
Figura 9	Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	66
Figura 10	Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	67
Figura 11	Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	68
Figura 12	Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas para <i>E. coli</i> diarreiogênica no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	69
Figura 13	Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	70
Figura 14	Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	71
Figura 15	Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	72
Figura 16	Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	73

Figura 17 Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas 74
para *E. coli* diarreio gênica no município de Itabirito/MG, no período
de junho de 2014 a dezembro de 2015.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Presença de <i>Escherichia coli</i> , localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais das áreas urbana e rural do município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.	46
Tabela 2	Presença de <i>Escherichia coli</i> , localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais da área urbana do município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.	47
Tabela 3	Presença de <i>Escherichia coli</i> , localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais das áreas urbana e rural do município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.	49
Tabela 4	Distribuição de EPEC, ETEC e EHEC em amostras de água para consumo de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.	52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* 45
nas áreas urbana e rural do município de Ouro Preto/MG, entre
junho/2014 e dezembro/2015.
- Gráfico 2 Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* 47
na área urbana do município de Mariana/MG, entre junho/2014 e
dezembro/2015.
- Gráfico 3 Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* 48
nas áreas urbana e rural do município de Itabirito/MG, entre
junho/2014 e dezembro/2015.

LISTA ABREVIATURAS

- (EPEC) - *E. coli* enteropatogênica
(ETEC) - *E. coli* enterotoxigênica
(STEC)- *E. coli* produtora de toxina shiga
(EIEC) - *E. coli* enteroinvasora
(EHEC) - *enterohemorrágica*

(EAEC) - *E. coli* enteroagregativa

(DEC) – *E.coli* diarreiogênica

(DAEC) - *E. coli* de aderência difusa

(FUNED) - Fundação Ezequiel Dias

(SUS) - Sistema único de saúde.

(GAL) – Gerenciamento de Ambiente Laboratorial

(LBTM) – UFOP Laboratório de biotecnologia e tecnologia dos microrganismo da Universidade Federal de Ouro Preto

(DATASUS) - Departamento de informática do Sistema Único de Saúde do Brasil.

(SISAGUA) - Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

RESUMO

O estudo foi realizado com o objetivo de contribuir para a melhor compreensão da vulnerabilidade das populações, no que se refere à qualidade microbiológica da água para consumo humano em três municípios da mesorregião de Belo Horizonte - Ouro Preto, Mariana e Itabirito. Um dos principais resultados alcançados foi o mapeamento das áreas com maior grau de contaminação, destacando-se a presença de patótipos diarreiogênicos de *Escherichia coli*. Foram avaliadas 1185 amostras de água, coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pela Portaria de potabilidade, do Ministério da Saúde. Foram incluídos pontos amostrais urbanos e rurais de abastecimento de água. Esses pontos foram georreferenciados e disponibilizados em um banco de dados para a Vigilância em Saúde dos Municípios, ofertando suporte para políticas públicas nas ações preventivas e de contenção dos surtos. O presente trabalho resultou da parceria institucional entre UFMG, UFOP e FUNED. Após avaliação do padrão microbiológico de potabilidade, pelo emprego de Colilert[®], as amostras foram submetidas a cultivo em MacConkey Agar, para isolamento de *E. coli*. As amostras isoladas foram avaliadas, por método de genética molecular, para pesquisa de marcadores de patogenicidade que definem os patótipos diarreiogênicos enteropatogênico (EPEC), enterotoxigênico (ETEC) e produtor de toxina shiga-enterohemorrágico (STEC-EHEC) da bactéria. As análises de potabilidade foram validadas pela FUNED e mensalmente publicadas no Sistema GAL da plataforma digital do SUS. Os pontos contaminados foram georreferenciados utilizando-se o geoprocessamento TerraView e o sistema gerenciador de banco de dados PostgreSQL, além análises estatísticas de Kernel. Dessa forma construiu-se uma base cartográfica digital dos que mostram gradientes de concentração. Essa ferramenta computacional contribui para uma análise geográfica do problema das contaminações reincidentes das águas, possibilitando a determinação dos locais com maior potencial para desenvolvimento de doença diarreica.

Palavras-chave: doença diarreica aguda, *Escherichia coli* diarreiogênica, geoprocessamento, potabilidade da água, vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

The study was carried out with the objective of contributing to a better understanding of the vulnerability of the populations regarding the microbiological quality of drinking water in three municipalities of the mesoregion of Belo Horizonte - Ouro Preto, Mariana and Itabirito. One of the main results achieved was the mapping of the areas with the highest degree of contamination, highlighting the presence of *Escherichia coli* diarrheogenic pathotypes. A total of 1185 water samples were collected, according to the criteria established by Ministry of Health Ordinance No. 2914. Urban and rural water supply points were included. These points were defined by geoprocessing and made available in a database for Health Surveillance of Municipalities, offering support for public policies in preventive actions and containment of outbreaks. The present work resulted from the institutional partnership of UFMG, UFOP and FUNED. After a potability evaluation, the samples were cultured in MacConkey Agar for the isolation of *E. coli* using Colilert®. The isolated samples were evaluated by molecular genetic method to investigate pathogenicity markers that define the enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC) and shiga-enterohemorrhagic toxin (STEC-EHEC) bacterial pathogens. The potability analyzes were validated by FUNED and monthly published in the GAL System of the SUS digital platform. The contaminated points were spatialized using the TerraView Geoprocessing software along with the the data were generated by PostgresSql, in addition to the statistical analysis of Kernel. In this way a database was generated generating the "digital maps" that show concentration gradients. This computational tool contributes to a geographic analysis of the problem of recurrent contamination of water in real time, making it possible to determine the points with the greatest potential for the development of diarrheal disease.

Keywords: acute infectious diarrhea, diarrheagenic *Escherichia coli*, geoprocessing, water potability, eidemiologic surveillance.

1 INTRODUÇÃO

1.1 NORMATIZAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA E A SAÚDE HUMANA

A vigilância em saúde tem suas ações fundamentadas em procedimentos técnicos normatizados pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, desde 1905. A publicação da American Public Health Association (APHA) apresenta a metodologia padronizada para a avaliação microbiológica da potabilidade das águas para consumo humano, pela pesquisa da presença de coliformes indicativos de contaminação. Recomenda, também, a tipificação de espécies patogênicas de microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) de veiculação hídrica. A água é uma necessidade da vida humana e todos têm direito ao acesso a água limpa e segura. Afinal, os seres humanos são compostos de, aproximadamente, 60% de água. Infelizmente, as mudanças climáticas comprometem a qualidade e a segurança da nossa água. O tempo mais quente faz com que mais água evapore e isso prepara o cenário para chuvas e inundações, o que diminui a qualidade da água e aumenta os riscos para a saúde. Em alguns casos, as inundações podem rever os sistemas de drenagem ou de tratamento de águas residuárias de uma região, aumentando o risco de exposição a bactérias e parasitas. Isso pode contaminar a água e os alimentos que consumimos (APHA, 2017).

1.2 HISTÓRICO DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA RELACIONADA À QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

A questão da qualidade da água para consumo humano no Brasil surgiu há cerca de 100 anos. Assim, na década de 20, houve a criação do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), instituído pelo Decreto-Lei n.º 3.987, com base no que então se denominava de “Reforma Carlos Chagas”, que reorganizou os serviços de saúde do País.

Em 1961, o Governo Federal regulamentou a Lei n.º 2.314/1954, que estabelece as normas gerais sobre defesa e proteção da saúde, promulgando o Código Nacional de Saúde por meio do Decreto n.º 49.974/1961. Alicerçado na Lei n.º 6.229/1975, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Saúde, e na Conferência Pan-Americana sobre qualidade da água, realizada em São Paulo, em outubro de 1975, o governo brasileiro promulgou o Decreto n.º 79.367/1977, atribuindo competência ao Ministério da Saúde para elaborar normas e estabelecer o padrão de potabilidade da água para consumo humano a serem observados em todo o território nacional. O mesmo determina que os órgãos e as entidades dos estados, municípios, Distrito Federal e territórios responsáveis pela operação dos sistemas de abastecimento público devem adotar, obrigatoriamente, as normas e o padrão de potabilidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

Com base neste Decreto, o Ministério da Saúde elaborou e aprovou uma série de legislações referentes à água para consumo humano, como, por exemplo, as normas e o padrão de potabilidade, aprovados pela Portaria n.º 56/1977, que se constituíram na primeira legislação federal brasileira sobre potabilidade de água para consumo humano editada pelo Ministério da Saúde. A partir daí, o tema ganhou relevância nas políticas públicas do Brasil, relacionando-se diretamente à saúde pública e à preservação ambiental.

Ainda nessa época, com o Plano Nacional de Saneamento (PLANASA), notou-se um aumento significativo do número de habitantes com acesso ao serviço de abastecimento de água tratada, especialmente nos núcleos urbanos. Contudo, apesar do grande avanço na implantação dos sistemas de abastecimento de água das áreas urbanas, a maioria dos sistemas e soluções alternativas de abastecimento localizados em distritos e localidades com menor densidade populacional não acompanhou estas mudanças. Assim, apesar da grande cobertura dos serviços de abastecimento de água em núcleos urbanos adensados e respectiva redução dos casos de doenças de veiculação hídrica, o mesmo não se observa nas localidades rurais e distritos distantes das sedes, tendendo a apresentar estrutura e operação precárias, quando comparados às sedes municipais.

Em 2000, foi elaborada a Portaria do Ministério da Saúde n.º 1.469, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Em 2003, o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIAGUA) passou a ser coordenado diretamente pela Secretaria de Vigilância em Saúde, no âmbito do Ministério da Saúde, por meio do Decreto n.º 4.726/2003. O VIGIAGUA é estruturado a partir dos princípios do Sistema Único de Saúde (SUS) e desempenha papel importante para garantir a qualidade e segurança da água para consumo humano no Brasil.

A partir de 2007, entrou em vigência a atual versão do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), fonte dos dados relativos a cadastro de usuários e análises de monitoramento de coliformes totais e fecais. O SISAGUA é um dos principais instrumentos do Programa VIGIAGUA, que visa a auxiliar o gerenciamento de riscos à saúde associados à qualidade da água para consumo humano. Desde então, vêm sendo realizadas ações junto aos técnicos e gestores de saúde municipais, com o objetivo de sensibilizá-los em relação à importância da identificação de vulnerabilidades, da prevenção de doenças de veiculação hídrica e do monitoramento da qualidade da água para consumo humano nos municípios de abrangência. O diagnóstico obtido a partir da vigilância, teoricamente, possibilita aos gestores tomarem as decisões em torno dos sistemas de abastecimento coletivos e alternativos, no sentido de se exigirem as intervenções adequadas, quando há ocorrência de não conformidades referentes à qualidade da água.

A partir dos dados inseridos ou enviados rotineiramente pelos profissionais do setor de saúde (Vigilância) e responsáveis pelos serviços de abastecimento de água (Controle), o SISAGUA gera relatórios com informações que possibilitam conhecer as características do abastecimento de água no País, tais como: cobertura populacional por cada uma das formas de abastecimento de água nos municípios, nos estados e no Brasil; relatório de amostras fora do padrão de potabilidade estabelecido pela legislação vigente para cada forma de abastecimento e municípios que não possuem informação no sistema. As referidas informações subsidiam a tomada de decisão do setor saúde em todas as esferas de gestão do SUS.

Em dezembro de 2011, o ministro de estado da saúde, considerando as legislações anteriores e decretos, criou a Portaria n.º 2.914/2011, que determina que os responsáveis pelo serviço de abastecimento devem realizar análises para controle da qualidade da água disponibilizada à população, para posterior envio às secretarias municipais de saúde. Estas, por sua vez, são

responsáveis pela realização de análises para monitoramento/vigilância da qualidade da água, em quantidade e periodicidade orientadas pela Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Ramos, 2013).

A Superintendência Regional de Saúde (SRS) de Belo Horizonte vem trabalhando no processo de consolidação do VIGIAGUA em seus municípios de abrangência. Uma das metas vem sendo a descentralização das análises de potabilidade das águas dos municípios mineiros e digitação de dados de controle e vigilância, atingindo 100% dos municípios com usuário cadastrado no SISAGUA. Isto inclui a implantação de cinco laboratórios municipais e parceria com laboratórios, como o Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM), Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com vistas à realização do monitoramento de coliformes totais e fecais. Esta descentralização contribuiu para o aumento do número de análises a partir do ano de 2012, incluindo o Município de Ouro Preto, com as análises mensais a cargo do LBTM/UFOP em trabalho conveniado com o VIGIAGUA de Ouro Preto e com a FUNED, contribuindo com o Plano de Fortalecimento de Vigilância em Saúde no Estado de Minas Gerais (Ramos, 2013).

1.3 A QUALIDADE DA ÁGUA NOS PAÍSES DESENVOLVIDOS E NOS PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO

A água constitui elemento vital não só à natureza, de um modo geral, como a todas as atividades desenvolvidas pelo homem. Seus múltiplos usos - abastecimento público, industrial e agropecuário, preservação da vida aquática, recreação e transporte - demonstram essa importância vital.

No entanto, apesar de todos os esforços para armazenar e diminuir o seu consumo, a água está se tornando, cada vez mais, um bem escasso e sua qualidade se deteriora cada vez mais rapidamente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, apresentando, desta forma, um risco potencial de comprometimento à saúde e ao bem estar do ser humano. Nascimento *et al.* (2013) afirmaram que a contaminação que vem ocorrendo ao longo dos anos, causada pelo desenvolvimento industrial, crescimento demográfico e ocupação do solo de forma

intensa e acelerada, tem provocado o comprometimento dos recursos hídricos disponíveis para consumo humano, aumentando, consideravelmente, o risco de doenças de transmissão ou de origem hídrica.

Até 1920, à exceção das secas do Nordeste, a disponibilidade de água no Brasil não apresentou problemas ou limitações. A cultura da abundância deste bem teve origem nesse período. Ao longo da década de 70 e, mais acentuadamente, nos anos 80, a sociedade começou a despertar para as ameaças a que estaria sujeita se não mudasse de comportamento quanto ao uso de recursos hídricos. Foram instituídas, nesses anos, várias comissões interministeriais para a busca reformas para aprimorar o sistema de uso múltiplo dos recursos hídricos e minimizar os riscos de comprometimento de sua qualidade, principalmente no que se refere às futuras gerações, pois a vulnerabilidade desse recurso natural já começava a se fazer sentir (Moraes & Jordão, 2002).

Segundo registros do Banco Mundial (2003), problemas de escassez e poluição da água vinham exigindo, dos governos e da sociedade em geral, uma maior atenção. Avanços expressivos foram alcançados ao longo dos últimos 55 anos, quando o Brasil ampliou seus sistemas de abastecimento de água para servir uma população adicional de 100 milhões de habitantes, enquanto mais de 50 milhões de brasileiros passaram a ter acesso a serviços de esgotamento sanitário. Uma em cada três pessoas no mundo - cerca de 2,4 bilhões de indivíduos - ainda não tem acesso a serviços de saneamento básico e água potável, concluiu um levantamento global da World Health Organization (WHO) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). No Brasil, observa-se que as condições evoluíram bastante nos últimos 25 anos (WHO/UNICEF 2015).

O País possui 19% dos recursos de água doce do mundo. A melhoria da gestão desses recursos, com ênfase no seu uso sustentável e de múltiplas finalidades, é um objetivo político cada vez mais importante para o governo brasileiro, particularmente nos estados áridos do Nordeste onde a água é escassa.

Uma vez que a água é crítica para a sobrevivência humana, as autoridades públicas de muitos países assumiu a responsabilidade central pelo gerenciamento deste recurso (D'Aguila *et al.*, 2000). O propósito primário para a exigência de qualidade de água é a proteção à saúde pública. Segundo os autores, os critérios adotados para assegurar essa qualidade têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que, se propriamente

implementadas junto à população, garantirão a segurança do fornecimento de água, promovendo a eliminação ou redução a concentrações mínimas de constituintes reconhecidos como perigosos à saúde.

Nas duas últimas décadas, a abrangência do suprimento de água nas áreas urbanas no Brasil tem se mantido razoável; apenas 4% da população urbana do mundo utiliza fontes impróprias. Entretanto, apesar da cobertura de canalização na área urbana, inadequações que comprometem a qualidade da água ainda permanecem. As redes de abastecimento são frequentemente prejudicadas por fluxos de água intermitentes, aumentando os riscos de contaminação (WHO/UNICEF, 2013).

Ashraf & Yunus (1997) e Nanan *et al.* (2003), ao pesquisarem sobre doenças de veiculação hídrica e saneamento, afirmaram que o uso de água poluída para consumo humano é a principal causa de muitos problemas de saúde, tal como doença diarreica, que acomete mais de um bilhão de pessoas por ano e mata mais de três milhões de pessoas - na maioria crianças - no mesmo período. Além do sofrimento às pessoas, os danos econômicos e ambientais provenientes da poluição da água são enormes. O tratamento inadequado de esgoto agrava a pobreza, através da poluição de fontes alimentícias dependentes de água, causando doenças e limitando o acesso à água potável segura.

Quase invariavelmente, o melhor método de assegurar água adequada para consumo consiste em formas e tratamento, evitando-se contaminações por dejetos provenientes de seres humanos e outros animais, os quais podem conter grande variedade microbiana, em especial, bactérias, vírus e protozoários. Falhas na proteção e no tratamento efetivo expõem a população a riscos de doenças intestinais e outras doenças infecciosas (D'Aguila *et al.*, 2000).

Os Estados Unidos, dentre os países desenvolvidos, são considerados tipicamente um dos países onde a proteção à saúde pública é altamente valorizada. Outros países desenvolvidos, como Japão, Nova Zelândia, Austrália e países europeus, procuram seguir o exemplo dos Estados Unidos. De outro lado, países subdesenvolvidos, como os da América Central e do Sul, Ásia e África, não investem tanto em saúde pública. Porém, sabe-se que, nos países onde já ocorre desenvolvimento industrial significativo, a condição de proporcionar água segura às populações de grandes centros produtivos se tornou ainda mais crítica, face à poluição dos mananciais de água potável por resíduos industriais (Branco, 1999). Desde o

final do século 19, em países desenvolvidos, tem ocorrido a redução do número de epidemias, devido à ênfase dada pelas autoridades aos cuidados com a saúde pública (Benicio & Monteiro, 2000).

Apesar da existência de legislação específica, pesquisas sobre a qualidade de água para consumo humano em diversas localidades brasileiras têm revelado que o padrão de potabilidade vigente não tem sido alcançado (Hoffman, 1995; Hoffman *et al.*, 1997; Giombelli *et al.*, 1998; David *et al.*, 1999; Sabioni, 2001). Ouro Preto é um exemplo dessa situação. Segundo observações de estudos realizados por Sabioni (2001), esse município não dispõe de um sistema adequado de tratamento de água destinada ao consumo humano. Desde 1993 (Lanna, 2003; Reis *et al.*, 2013), tem sido constatada a participação de *E. coli* diarreiogênica na etiologia das diarreias infantis em Ouro Preto, MG, mostrando a importância do estudo desses tipos patogênicos na cadeia de transmissão das doenças diarreicas locais.

1.4 A QUALIDADE DO ABASTECIMENTO DE ÁGUA NOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS

Segundo Puppi (1973), o objetivo de um sistema de abastecimento de água de uma comunidade é fornecer água que, em quantidade e qualidade, seja conveniente a todos os usos a que se presta, de modo que a população inteira dela se beneficie, recebendo-a junto ao domicílio com o mínimo dispêndio possível. Para todo o mundo, a água é essencial para beber, cozinhar e para a higiene pessoal e doméstica. De acordo com as Normas Mínimas em Matéria de Abastecimento de Água e Saneamento, na maioria dos casos, os principais problemas de saúde relacionados ao abastecimento de água inadequado devem-se às más condições de higiene por falta de água e ao consumo de água que em dada altura tenha ficado contaminada.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO/UNICEF, 2013), no Brasil, houve uma melhoria na distribuição de água canalizada do ano de 1990 para o ano de 2011. No setor urbano, o percentual era de 92% em 1990 e de 96% em 2011. Já no setor rural, em 1990 e 2011, os valores eram de 39% e 65%, respectivamente.

Nos sistemas de distribuição de água potável, a qualidade desta pode sofrer uma série de mudanças, fazendo com que a qualidade da água na torneira do usuário se diferencie da qualidade da água que deixa a estação de tratamento (Barcelos *et al*, 1998). Freitas *et al*. (2001) incluem, dentre alguns fatores que influenciam tais mudanças, a qualidade química e biológica da fonte hídrica; a eficácia do processo de tratamento, reservatório (armazenagem) e sistema de distribuição; idade, tipo, projeto e manutenção da rede e a qualidade da água tratada.

No meio rural, bem como nas instituições e indústrias isoladas, fora dos núcleos urbanos, o suprimento de água é particular, explorando-se o recurso hídrico local que mais se adequa às necessidades. De acordo com Puppi (1973), a solução pode estar na escavação ou perfuração de um poço freático, na captação de uma nascente ou de um pequeno curso mais ou menos próximo e resguardado da poluição, ou, ainda, na perfuração de um poço artesiano. Em caso extremo, pode ser aproveitada a água da chuva. Estudando comunidades rurais, Welch *et al*. (2000) verificaram que, geralmente, a água fornecida para comunidades rurais é de qualidade inferior à daquela oferecida para áreas urbanas.

Nas zonas urbanas, ao contrário, o suprimento particular é que se depara com sérios entraves, entre os quais o da obtenção de água potável e do controle higiênico sanitário do processo de abastecimento. O adensamento da população, o consumo público, a maior demanda relativa dos outros serviços e a distância do manancial tornam obrigatória a implantação de um sistema de condutos e instalações planejado, dirigido e controlado por um departamento que atenda, eficientemente, a todas as modalidades da demanda, domiciliar, comercial, industrial e pública.

1.5 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E AMBIENTAIS E O AGRAVO DE DOENÇAS INFECCIOSAS NO BRASIL

O ano de 2014 foi o sexto ano mais quente já observado. E o clima de 2015 começou alterado também, com eventos extremos de temperatura e precipitação de chuvas, para mais ou para menos, espalhados por todos os continentes. A alteração climática mundial tem sido

atribuída, por muitos autores, ao acúmulo de gases do efeito estufa, lançados na atmosfera pelo homem nos últimos 150 anos (Barcellos *et al.*, 2009).

O aumento da temperatura, da quantidade de chuvas e da umidade devido às alterações climáticas eleva os riscos de proliferação de doenças transmitidas pela água, como leptospirose e salmonelose, que tendem a aumentar após chuvas intensas. A água de aquíferos mais quentes também facilita a proliferação de microrganismos, assim como o zooplâncton pode funcionar como reservatório de algumas espécies bacterianas, como *Vibrio cholerae*, agente da cólera. Estimativas mostram que o aumento da temperatura em 1 °C eleva o número de microrganismos em 10 vezes. O processo de mudanças climáticas e ambientais globais, que vem se agravando nas últimas décadas, tem sido amplamente divulgado pela mídia. Estas alterações representam um desafio para a sociedade e setores do governo, que precisam definir as causas e o papel das alterações ambientais na saúde da população. É importante avaliar os cenários de mudanças climáticas e ambientais e suas incertezas para o Brasil. Além disso, os recursos que podem ser utilizados para desenvolver uma rede de diagnóstico, modelagem, análise e intervenção sobre as repercussões dessas mudanças sobre as condições de saúde devem ser incrementados. Os principais grupos de doenças que podem ser afetados por essas mudanças são as doenças de veiculação hídrica. No entanto, os riscos associados às mudanças climáticas globais não podem ser avaliados em separado do contexto globalização, mudanças ambientais e precarização de sistemas de governo. Cabe ao setor saúde não só prevenir esses riscos, mas atuar na redução das vulnerabilidades sociais (Barcellos *et al.*, 2009). E este cenário continua, a mudança climática está acontecendo e está afetando nossa saúde. A mudança climática afeta o abastecimento alimentar, a propagação de doenças infecciosas, nossos sistemas de água e qualidade do ar e muito mais. Todos têm impactos significativos na saúde humana (APHA 2017).

1.6 A CAPTAÇÃO E O FORNECIMENTO DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO NA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE: MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E ITABIRITO

A principal fonte de captação de águas para o abastecimento público nos municípios da mesorregião de Belo Horizonte, localizada no Quadrilátero Ferrífero (QF), é proveniente das bacias hidrográficas do alto rio das Velhas e do rio Doce. Nos municípios de Ouro Preto e Mariana, o abastecimento público também apresenta outras formas de captação de água superficial a partir das nascentes, muito comuns no relevo montanhoso. As populações dessas localidades também coletam água de pequenas nascentes nas encostas de morros, utilizando sistema particular de distribuição alternativa de mangueiras (Neves, 2003), principalmente nos distritos distantes da sede dos municípios (Borba *et al.*, 2004).

O sistema de abastecimento público de água da sede do município de Itabirito foi planejado a partir da década de 1960, iniciando a sua implantação em 1974 e a sua operação no ano de 1978, quando a Fundação SESP, órgão do Governo Federal, criou o Serviço Autônomo de Água e Esgoto - SAAE, uma autarquia municipal. Atualmente, o SAAE possui três outorgas de captação de água em mananciais superficiais, as quais, juntas, lançam cerca de 160 L/s na Estação de Tratamento de Água (ETA) para o tratamento convencional e posterior reservação e distribuição à população (www.saaeita.mg.gov.br).

1.7 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE: MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E ITABIRITO

Os municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito encontram-se na porção sudeste do QF, em Minas Gerais. Ouro Preto está situado a 1.061 m de altitude, tem sua localização determinada pelas coordenadas geográficas 20°23'13'' S e 43°30'25'' W e apresenta área de 1.247 km². Mariana localiza-se a 20°22'40'' S e 43°24'58'' W, a 712 m de altitude e apresenta área de 1.196,7 km². Itabirito localiza-se a 20°15'12'' S e 43°48'05'' W, a uma altitude de 901 m e possui área de 546,6 km² (www.geografos.com.br).

1.8 GEOPROCESSAMENTO DE DADOS PARA O FORTALECIMENTO DA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Geoprocessamento é o conjunto de técnicas computacionais que opera sobre base de dados, registro de ocorrências, georreferenciados, para transformar em informações relevantes, cujo valor social está na sua capacidade de apoiar decisões (Xavier-da-Silva, 2001). O TerraView é um aplicativo construído sobre a biblioteca de geoprocessamento TerraLab, tendo como objetivo apresentar à comunidade um visualizador simples de dados geográficos, com recursos de consulta a análise destes, associado ao PostgreSQL, que é um sistema gerenciador de banco de dados (www.dpi.inpe.br/terraview/index.php).

A capacidade brasileira de geração de dados com referência espaço-temporal cresceu muito. Entretanto, as políticas de acesso não avançaram como desejado. Dados espaciais com função social, geodados, precisam ser liberados (*habeas data*), estabelecendo uma possibilidade de acesso integrado entre os sistemas de informação de saúde e os sistemas de informações climático-ambientais. Mais que isso, é preciso uma nova compreensão, mais abrangente, para os sistemas de informação de saúde (SIS). Para os novos desafios da vigilância em saúde de base territorial, ter acesso aos dados de natureza climática e ambiental, de modo mais direto, é essencial. Trabalhar esta integração é fundamental para o setor de saúde. Não é uma integração somente tecnológica, exige um esforço multi-institucional e a formação de recursos humanos na saúde com capacidade para produzir, coletar, armazenar, recuperar, tratar e analisar estes dados e informações. No entanto, a capacidade brasileira de analisar este conjunto de dados, em várias escalas e unidades espaciais, ainda é bem menor que a nossa capacidade de produzi-los. É preciso estabelecer novos métodos de análise espaço-tempo, que permitam detectar os padrões e as alterações na ocorrência de múltiplos eventos, em apoio à vigilância epidemiológica de base territorial. No campo das Tecnologias da Informação (TI), as geotecnologias permitem analisar e reconhecer padrões espaço-temporais de dados provenientes de fontes diversas. São estes padrões que podem revelar processos, cujas estruturas devem ser detectadas, monitoradas e visualizadas.

Para vencer este desafio, é necessário compartilhar trabalhos, dados, metodologias, *softwares* e resultados. Esse uso compartilhado se desenvolve com base em três linguagens comuns: a primeira, a do espaço, a informação que permite localizar os elementos de análise nos territórios; a segunda, a metodológica, que posiciona o problema como tendo muitas dimensões e permite superar a armadilha da redução a uma determinação unicamente ambiental, a uma determinação social ou a uma determinação biológica exclusiva para o processo saúde-doença em investigação; a terceira, a técnico-científica, que apresenta necessidade de novos métodos e instrumentos para tratar um problema intrinsecamente complexo (Barcellos *et al.*, 2009).

1.9 A QUALIDADE DA ÁGUA E OS COLIFORMES

A avaliação da qualidade da água visando à preservação da saúde humana no âmbito ambiental, referente às águas de recreação, é normatizada pela resolução n.º 357, de 17 de março de 2005 e, no contexto específico do abastecimento municipal da água para o consumo humano, a legislação vigente é a Portaria n.º 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde. O conceito abrangente de água potável, que confere segurança microbiológica a essas águas, está relacionado ao controle das contaminações fecais de diferentes origens, incluindo os esgotos (Portaria Conama, 2005 e Portaria 2914, 2011).

Os coliformes são mesófilos, mas, a espécie *E. coli* se distingue dos demais pela significativa habilidade metabólica na temperatura de 42 °C, sendo reconhecida como coliforme termotolerante. Para pesquisa da qualidade microbiológica da água, o método laboratorial utilizando substratos enzimáticos mais recomendado atualmente pela praticidade e segurança é a combinação de substrato que revela a produção da enzima betagalactosidase, interpretada como presença de coliformes totais, e substrato que indica a produção da enzima glucuronidase, produzida por *E. coli*. O teste Colilert®(IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EUA) é, hoje, amplamente recomendado (Resolução, 2005).

1.10 COLIFORMES TOTAIS E *E. coli*: PARÂMETROS NORMATIVOS PARA QUALIDADE DA ÁGUA

A microbiota intestinal humana é extremamente rica e diversa. Os microrganismos membros desta comunidade, a princípio, não são agentes de doenças entéricas, mas, em situações específicas, estão associados à etiopatogenia de infecções em outros órgãos. Estes organismos podem ser veiculados por água de consumo. Encontram-se, nesse grupo, denominado coliformes totais, vários gêneros bacterianos da família *Enterobacteriaceae* como, por exemplo: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Providencia*, além das amostras indígenas de *E. coli*. A espécie *E. coli* é tida como indicador de contaminação fecal recente, devido ao *habitat* intestinal preferencial (Nogueira *et al.*, 2003).

A água, como elemento fundamental da natureza viva, abriga inúmeros organismos provenientes de contaminação fecal, sejam membros da microbiota intestinal indígena ou não. Alguns deles apresentam potencial de virulência maior, considerados grupos patogênicos, como as bactérias *Salmonella enterica*, do gênero *Shigella* e os diversos patótipos diarreiogênicos de *E. coli*, o vírus da hepatite A e da poliomielite. Além desses, há a possibilidade de outros contaminantes já adaptados ao meio ambiente, representados por algas, protozoários, fungos, bactérias e vírus (Rivera & Martins, 1996; Rebouças *et al.*, 1999). Muitos desses organismos são, preferencialmente, de vida livre, devido a suas exigências, embora, ocasionalmente, adaptam-se ao homem, podendo atuar como patógenos veiculados pela água para consumo. Entre estes, podem ser citados o protozoário *Cryptosporidium* e as espécies bacterianas *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* (Reasoner, 1998).

O interesse mundial pela qualidade de água para consumo justifica-se pela associação entre água contaminada e doenças infecciosas (Musa *et al.*, 1999). Em 2000, Welch e colaboradores estimaram que 40% da população, em muitos países da América Latina, consumiam água de qualidade inferior.

Momba & Kaleni (2002), ao detectarem diversas enterobactérias, como *S. enterica* e *E. coli*, em recipientes usados para armazenar água potável, afirmaram que a água que achamos estar limpa e pura possivelmente está suficientemente contaminada com microrganismos patogênicos para representarem risco para a saúde. Assim, de acordo com a Portaria n.º

2914/2011, alguns meios são necessários para assegurar que a água esteja própria para o consumo.

Organismos transmitidos por água normalmente multiplicam-se no trato intestinal e são eliminados nas fezes. A poluição fecal em água de abastecimento pode acontecer, portanto, se a água não é tratada corretamente. Os patógenos potenciais infectam um novo hospedeiro quando a água contaminada é consumida (Robbins-Browne, 1987; Bruni *et al.*, 1997). Se a água é consumida em quantidades grandes, ela pode ser infecciosa mesmo se contiver uma concentração baixa de organismos.

Não é usualmente prático examinar diretamente a água para os vários organismos patogênicos que podem estar presentes. D'Aguila *et al.* (2000) registraram que uma enorme variedade de agentes de doenças em seres humanos está associada à água para consumo, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Conferir toda a água fornecida para consumo para cada um destes agentes seria um trabalho difícil, demorado e de alto custo financeiro. Então, na prática, são usados organismos indicadores, segundo Lopez-Pila & Szewzyk (2000).

A utilização do grupo coliforme como indicador de qualidade de água é um tema que tem gerado polêmica entre os pesquisadores. Entretanto, ainda hoje, é o método recomendado pela Portaria n.º 2914/2011, que regulamenta a qualidade da água.

1.11 CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *E. coli*

E. coli, membro da família *Enterobacteriaceae*, é a espécie anaeróbia facultativa mais abundante na microbiota intestinal de seres humanos e outros animais. A bactéria é um bastonete Gram negativo, oxidase negativo, fermentador de carboidratos (Bopp *et al.*, 1999; Kuhnert *et al.*, 2000).

E. coli coloniza o intestino de seres humanos desde as primeiras horas depois do nascimento. Usualmente, a bactéria possui a capacidade de exercer efeito benéfico sobre o hospedeiro, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. A relação entre a maioria das amostras de *E. coli* e o hospedeiro é mutualística. Porém, existem algumas estirpes desta espécie que representam tipos genéticos que podem causar uma variedade surpreendente de doenças, incluindo doença diarreica de

natureza não inflamatória e inflamatória, síndrome hemolítico-urêmica, infecção urinária, meningite neonatal, pneumonia e septicemia. Essa versatilidade tem sido associada ao fato de diferentes linhagens de *E. coli* terem adquirido diferentes marcadores genéticos de patogenicidade, definindo, assim, diferentes patotipos (Kaper *et al.*, 2004).

As doenças diarreicas são uma das principais causas de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que cerca de 10,5% das mortes nesta faixa etária tenham sido causadas por diarreia em 2010 (Liu *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças regionais são imensas e a proporção de mortes por diarreia pode chegar a níveis bem mais elevados nos países menos desenvolvidos (Fischer Walker *et al.*, 2012).

Atualmente, são reconhecidos seis (ou sete) patotipos diarreiogênicos de *E. coli*, quais sejam, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), incluindo seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). As categorias podem ser diferenciadas com base em marcadores genéticos específicos, em especial, associados a habilidades de patogenicidade das mesmas (Kaper *et al.*, 2004). Os patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e algumas de suas características mais relevantes estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Características gerais dos patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Hospedeiro	Sítio de colonização	Doença	Reservatório/ fonte	Tratamento	Mecanismo de adesão	Genes
tEPEC ¹	Crianças < 5 anos, adultos (dose infectante elevada)	Intestino delgado	Diarreia aquosa profusa	Seres humanos	Reidratação oral, antibioticoterapia (casos persistentes)	Lesão A/E ⁹	<i>eae, bfp</i>
aEPEC ²				Seres humanos, outros animais			<i>eae</i>
ETEC ³	Indivíduos imunocomprometidos, crianças < 5 anos, viajantes	Intestino delgado	Diarreia persistente, diarreia aquosa, diarreia do viajante	Alimentos, água, seres humanos, outros animais	Reidratação, antibioticoterapia	Mediada por CF ¹⁰	Diversos que codificam CF, LT ¹¹ , ST ¹²
STEC/EHEC ⁴	Adultos e crianças	Íleo distal, cólon	Diarreia aquosa, colite hemorrágica, SHU ⁸	Seres humanos, outros animais, alimentos, água	Hidratação, cuidados de apoio para SHU	Lesão A/E	<i>eae, stx</i>
EIEC ⁵	Crianças < 5 anos, adultos viajantes, indivíduos imunocomprometidos	Cólon	Shigelose/disenteria bacilar	Seres humanos, outros animais, alimentos, água	Reidratação oral, antibioticoterapia	Invasão	<i>ipa, ial</i>
EAEC ⁶	Adultos, crianças	Intestino delgado e cólon	Diarreia do viajante, diarreia persistente	Alimentos	Antibioticoterapia, reidratação oral	Agregativa (invasão)	<i>aatA, aaiC</i>
DAEC ⁷	Crianças, adultos	Intestino	Diarreia aquosa persistente	Não definido	Reidratação	Difusa (invasão)	Não definido

¹, *E. coli* enteropatogênica típica; ², *E. coli* enteropatogênica atípica; ³, *E. coli* enterotoxigênica; ⁴, *E. coli* produtora de shiga toxina/*E. coli* enterohemorrágica; ⁵, *E. coli* enteroinvasora; ⁶, *E. coli* enteroagregativa; ⁷, *E. coli* de aderência difusa; ⁸, síndrome hemolítica urêmica; ⁹, histopatologia *attaching and effacing*; ¹⁰, fatores de colonização; ¹¹, enterotoxina termolábil; ¹², enterotoxina termoestável. Adaptado de Croxen *et al.*, 2013.

1.11.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC é considerada agente importante de doença diarreica, associada a taxas elevadas de mortalidade entre crianças menores de um ano, em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004). O patotipo apresenta, como ponto central de sua patogênese, a capacidade de causar a lesão *attaching and effacing* (A/E), relacionada ao gene *eae*. Apresenta um padrão de adesão localizada em células epiteliais do intestino (Kaper *et al.*, 2004).

A virulência das amostras de EPEC está relacionada, principalmente, à sua capacidade de aderir à superfície de enterócitos e induzir vias de sinalização que resultam no surgimento de lesões intestinais. Estas lesões reduzem a capacidade de absorção, resultando em quadro de diarreia (Moura, 2009). A diarreia causada por EPEC decorre de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda de superfície absorptiva devido à lesão A/E (Kaper *et al.*, 2004).

A infecção por EPEC pode ser dividida em três estágios: o primeiro estágio, aderência localizada, envolve interação íntima entre a bactéria e superfície da célula hospedeira. Nas amostras de EPEC típica, esta aderência é mediada por uma fímbria do tipo IV, denominada Bfp (*bundle-forming pilus*) (Girón *et al.*, 1991; Trabulsi & Altherrum, 2008). O conjunto de 14 genes responsáveis pela codificação de *bfp* são carregados por um plasmídio de 60 MDa, denominado EAF (EPEC *adherence factor*) (Stone *et al.*, 1996). O segundo estágio, transdução de sinais, envolve um aparato de secreção do tipo III, que induz a secreção de proteínas de EPEC, chamadas Esps (*E. coli secreted proteins*; EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, Map e Tir). As funções de poucas destas proteínas são conhecidas em detalhe. De uma forma geral, elas desencadeiam a transdução de sinais em cascata nas células hospedeiras, levando a um rearranjo dos componentes do citoesqueleto. Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas estão inseridos na região LEE (Elliot *et al.*, 1998). O terceiro estágio, aderência íntima, envolve a atividade do gene cromossômico *eae*, que expressa a proteína intimina, responsável pelo contato íntimo entre a bactéria e a célula epitelial. O acúmulo de filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto como α -actina, talina, miosina e ezerina, formam o pedestal, propiciando a endocitose da bactéria pela célula hospedeira (Finlay *et al.*, 1992).

1.11.2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

A denominação do patotipo decorre da sua capacidade de produzir enterotoxinas. É a categoria mais comumente associada a diarreia grave em leitões (Blanco *et al.*, 1997; Trabulsi & Althernun, 2008). Em seres humanos, além de agente relevante de diarreia, em especial, em crianças, é conhecida por causar o quadro conhecido como diarreia do viajante. As amostras podem expressar toxina termolábil, termoestável ou ambas (Nataro & Kaper, 1998).

As manifestações clínicas classicamente associadas com a infecção por ETEC incluem dor abdominal, vômito, náusea e febre baixa. A bactéria coloniza o intestino delgado, onde sintetiza as enterotoxinas, resultando em aumento da secreção de eletrólitos para o lúmen intestinal, seguida pela passagem de água por osmose. A diarreia é do tipo aquosa, podendo ser profusa (Torres, 2010).

Assim, o mecanismo de patogenicidade de ETEC envolve a colonização da mucosa intestinal e produção de enterotoxinas. Estas provocam alteração nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos, levando à alteração no equilíbrio hidrossalino do lúmen intestinal, resultando na secreção de eletrólitos e, consequentemente, na redução de absorção de água. As enterotoxinas termoestáveis (STa e STb) são capazes de resistir ao tratamento térmico, a 100 °C, por 30 min. A toxina STa é codificada por um plasmídio e, geralmente, está associada a genes codificadores de fatores de colonização (CFAs). Esta toxina se liga-se a receptores das células intestinais e ativa a enzima guanil ciclase, o que leva a um aumento dos níveis de GMPc, resultando em secreção de líquido para a luz intestinal e subsequente diarreia (Mühldorfe & Hacker, 1994). A codificação da enterotoxina STb é controlada por genes plasmidiais (Echeverria *et al.*, 1992) e, apesar de ser importante na diarreia em suínos, sua relevância na diarreia humana não é comprovada, embora já tenha sido detectada em amostras de *E. coli* de origem humana (Nataro & Kaper, 1998).

A adesão deste grupo bacteriano aos enterócitos ocorre através de fatores de colonização (CFA), adesinas fimbriais ou não fimbriais (Blanco *et al.*, 1997), representados por filamentos proteicos delgados ou por proteínas amorfas que cobrem a superfície bacteriana. Os CFA são característicos deste patotipo diarreio gênico de *E. coli*.

Estudos têm indicado que amostras de ETEC, similarmente a outras classes diarreiogênicas, possuem genes de virulência além dos já conhecidos codificadores das toxinas e fatores de adesão. Incluído entre estes genes menos conhecidos, encontra-se *tib A*, o qual codifica uma adesina membro da família das proteínas autotransportadoras, que exercem diferentes papéis na patogênese bacteriana (Henderson & Nataro, 2001).

Alguns autores têm demonstrado a presença do patotipo em animais selvagens, alguns deles vivendo em proximidade com o gado bovino. Doença no ser humano já foi relacionada à ingestão de carne de caça, sugerindo que animais selvagens possam ser hospedeiros da bactéria (Sánchez *et al.*, 2010).

1.11.3 *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC) e enterohemorrágica (EHEC)

STEC e seu subgrupo EHEC estão consistentemente associado com doença diarreica grave em seres humanos. Amostras de STEC/EHEC estão presentes na microbiota de ruminantes, especialmente bovinos, favorecendo a infecção do ser humano (Hartland *et al.*, 2013). O patotipo está associado ao quadro denominado colite enterohemorrágica, que pode evoluir para síndrome hemolítico-urêmica. A doença, do tipo inflamatória, é autolimitada, mas, em algumas situações, pode ser fatal. Caracteriza-se pela eliminação de fezes com sangue, com duração aproximada de 4 a 10 dias. Inicialmente, o paciente apresenta dor abdominal e diarreia aquosa, 1 a 2 dias após a ingestão do alimento contaminado, progredindo para diarreia sanguinolenta com dor abdominal aguda (Adams & Moss, 2008).

STEC/EHEC produzem uma toxina que apresenta atividade citotóxica sobre células Vero, conhecida como toxina shiga, extremamente potente e responsável por muitas das manifestações observadas (Nataro & Kaper, 1998). Dois grupos principais imunologicamente distintos de toxinas, não passíveis de reações cruzadas, chamados Stx₁ e Stx₂, podem ser sintetizados (Konowalchuk *et al.*, 1977). Os genes responsáveis pela codificação das subunidades A e B das toxinas shiga (*stxAB*, também chamados *sltAB* ou *vtxAB*) estão organizados em óperons. Os genes que codificam Stx₁ são carregados por bacteriófagos e aqueles responsáveis por Stx₂ podem ser encontrados tanto em bacteriófagos como no cromossomo bacteriano (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998).

1.11.4 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

EIEC é um patotipo de DEC bastante semelhante a *Shigella*. Ambos são capazes de invadir o cólon e elaborar uma ou mais enterotoxinas, que podem ter papel importante no início do quadro diarreico. A invasão é o principal mecanismo de patogenicidade de EIEC e compreende a penetração em células M, seguida pela lise do vacúolo endocítico, invasão de enterócitos, multiplicação intracelular, movimento direcional no citoplasma e invasão das células adjacentes, culminando com uma resposta inflamatória marcante (Nataro e Kaper, 1998; Trabulsi e Althernun, 2008; Caliman, 2010). Embora a dose infectante de *Shigella* seja baixa, por volta de 10 a algumas centenas de células, estudos demonstraram que a dose infectante de EIEC geralmente é de 10^6 a 10^8 células, sendo que o período de incubação da doença pode variar de 2 a 48 horas com média de 18 horas (Forsythe, 2013). As infecções causadas pelas cepas enteroinvasivas caracterizam-se clinicamente por diarreia profusa, podendo ter sangue e muco nas fezes (Nataro e Kaper, 1998).

EIEC pode ser caracterizada por seus antígenos O, sendo os mais frequentes: O28, O124, O136 e O173 (Ørskov *et al.*, 1991), pela ausência do antígeno flagelar e pela capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaias (Formal & Hornick, 1978). O indicativo mais importante para o reconhecimento de uma amostra EIEC é o teste da descarboxilação da lisina negativo. Este grupo não fermenta lactose ou fermenta tardiamente e não possui flagelo, sendo, portanto, imóvel (Taylor *et al.*, 1988).

1.11.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC é um enteropatógeno emergente que vem sendo reconhecido como causa de diarreia em crianças e adultos de países em desenvolvimento (Torres, 2010). O patotipo pode causar um quadro agudo, mas, geralmente, está associado com um quadro mais persistente, associado à desnutrição, o que confere ao mesmo um papel mais relevante ainda no âmbito de saúde pública de países em desenvolvimento. É uma categoria que se caracteriza pela elevada heterogeneidade quanto aos aspectos genéticos e fenotípicos (Nataro, 2005; Walker *et al.*, 2010). Este patotipo diarreiogênico tem sido considerado como a segunda causa mais comum de diarreia do viajante (Jafari *et al.*, 2012).

A característica principal de EAEC é a capacidade de representar um padrão de adesão exclusivo em determinadas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, como células HEp-2 e

HeLa. No padrão de aderência agregativa, as bactérias apresentam-se aderidas umas às outras, à superfície das células, bem como à superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração que lembra tijolos empilhados formando agregados heterogêneos ou distribuindo-se em formas de cordões. A configuração em "pilha de tijolos" é considerada uma condição obrigatória para o padrão típico de aderência agregativa (Andrade *et al.*, 2011).

A produção de diferentes tipos de toxinas foi evidenciada em amostras de EAEC. (Savarino *et al.*, 1991) identificaram a produção de uma proteína homóloga à enterotoxina termoestável (STa), designada EAST1 (enterotoxina termoestável de EAEC). EAST1 é uma proteína de 30 aminoácidos, que contém quatro resíduos de cisteína, diferentemente de STa, que contém seis resíduos. Funcionalmente, EAST1 é muito similar às toxinas termoestáveis de ETEC.

Eslava *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma proteína de 108 kDa a partir da amostra EAEC O42, a qual foi denominada Pet (*plasmid-encoded toxin*). Pet é uma toxina termolábil que induz aumento na diferença de potencial e na corrente de curto-circuito em preparações jejunais de rato montadas em câmaras de Ussing. Esses efeitos são acompanhados de uma diminuição da resistência elétrica nos tecidos tratados, aumento na liberação de muco, esfoliação celular e desenvolvimento de abscessos nas criptas. Em culturas de tecidos *in vitro*, Pet provoca perda do contato celular, seguida de arredondamento e desprendimento das células do substrato (Navarro-Garcia *et al.*, 1999).

De uma forma geral, a patogênese de EAEC envolve três estágios, a saber: 1. Aderência inicial à mucosa pelas fímbrias agregativas e outros fatores de colonização; 2. Produção de uma camada de muco, provavelmente pela bactéria e pela mucosa intestinal. EAEC adere na mucosa intestinal e estimula a secreção de muco (Huang & DuPont, 2004), formando uma espécie de biofilme. Este biofilme facilita a permanência de EAEC na superfície dos enterócitos (Tzipori *et al.*, 1992). Isto pode ser a explicação para algumas das características clínicas da diarreia provocada por este grupo, que inclui presença de muco nas fezes e diarreia prolongada (mais de 14 dias) (Henderson *et al.*, 1990); 3. Produção de toxinas com intensa resposta inflamatória. A resposta inflamatória acarreta a liberação de citocinas (principalmente IL-8), que causam toxicidade na mucosa e secreção intestinal (Greenberg *et al.*, 2002).

1.11.6 *E. coli* de aderência difusa (DAEC)

Amostras de *E. coli* incluídas neste grupo são identificadas pelo seu padrão de aderência difuso em cultura de células epiteliais (Nataro & Kaper, 1998). A fímbria F1845 foi caracterizada, em 1989, como sendo responsável pela adesão difusa das amostras de DAEC (Bilge *et al.*, 1989). O gene que codifica esta fímbria pode estar presente no cromossomo ou em plasmídios, sendo que a fímbria mostra homologia com os membros da família Dr de adesinas (Nowicki *et al.*, 1990).

Amostras de DAEC induzem efeitos citopáticos caracterizados pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem a bactéria aderida (Kaper *et al.*, 2004). Bernet Camard *et al.* (1996) postularam que as injúrias às microvilosidades provocadas por *E. coli* 1845 podem ser resultado da desorganização da rede do citoesqueleto celular. A interação da fímbria F1845 com DAF (receptor para C1845 - proteína ancorada ao GPI) (Caras *et al.*, 1987) pode promover a transdução de sinais que poderão induzir a distribuição de F-actina, resultando na lesão das microvilosidades. Essas alterações em muitas células podem resultar em diarreia (Bernet-Camad *et al.*, 1996).

A importância da categoria DAEC em infecções do trato urinário (UTI) também tem sido descrita (Nowicki *et al.* 1990). Estudos recentes mostram que algumas amostras de DAEC carregam fatores de patogenicidade encontrados em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (Johnson & Stell, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da qualidade microbiológica dos mananciais utilizados para abastecimento de comunidades já, há algum tempo, tem se mostrado como importante forma de proteção à saúde da população usuária e imprescindível, diante da falta de dados para a caracterização adequada destas águas. Embora exista um grande volume de informação sobre o isolamento de amostras de *E. coli* patogênicas para o ser humano e outros animais, sua ocorrência no meio ambiente é pouco estudada, embora a importância da água e de alimentos na veiculação desses patógenos já tenha sido registrada.

Assim, pareceu-nos oportuno investigar a presença de grupos diarreio gênicos de *E. coli* em água para consumo, considerando o atual agravamento de mudanças climáticas que têm sido apontadas como fator determinante para o aumento da prevalência de doenças de veiculação hídrica.

No Brasil, os relatos sobre a detecção dos tipos diarreio gênicos de *E. coli* em água referem-se, em geral, a pesquisas nos mananciais aquíferos de águas litorâneas, lagoas e rios. Quanto às águas de abastecimento, os registros de investigações são escassos. Alguns estudos relatam a ausência de amostras diarreio gênicas de *E. coli* em água para consumo, enquanto outros apontam para a detecção de diferentes patótipos diarreio gênicos do organismo, incluindo amostras resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas. Em Ouro Preto, a detecção de diversos patótipos diarreio gênicos da bactéria em água para consumo doméstico aponta a água como importante fator de risco para esta endemia na região. Assim, conduzimos este estudo prospectivo, para avaliação da presença de patótipos diarreio gênicos de *E. coli* em água para consumo em Ouro Preto e municípios adjacentes (Mariana e Itabirito), que compõem a mesorregião de Belo Horizonte. O significativo número de amostras necessário para a avaliação da significância estatística dos dados a serem obtidos, considerando o amplo território incluído na proposta, é garantido pelo trabalho colaborativo

do LBTM-UFOP com os serviços da Vigilância Ambiental dos municípios envolvidos por meio de convênios previamente firmados. Os dados obtidos provenientes das análises microbiológicas de potabilidade das amostras são cadastrados no sistema GAL/SISAGUA do DATASUS, oferecendo transparência aos resultados gerados. Os resultados compõem um banco de dados georreferenciados. O geoprocessamento deste estudo prospectivo é inédito e está contribuindo para a proposição de ações preventivas de surtos no âmbito da Vigilância Epidemiológica local e, acreditamos, servirá de modelo para outros municípios brasileiros.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de patótipos diarreiogênicos de *E. coli* em água para consumo dos municípios da mesorregião de Belo Horizonte - Ouro Preto, Mariana e Itabirito, nos pontos de contaminação georreferenciados, como modelo inovador de ação em Vigilância Epidemiológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação microbiológica de potabilidade da água para consumo humano coletada nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito e cadastramento dos dados no GAL/DATASUS.
- Georreferenciamento dos pontos de contaminação.
- Pesquisa dos patótipos diarreiogênicos de *E. coli* (EPEC, ETEC e STEC/EHEC) por método de genética molecular.

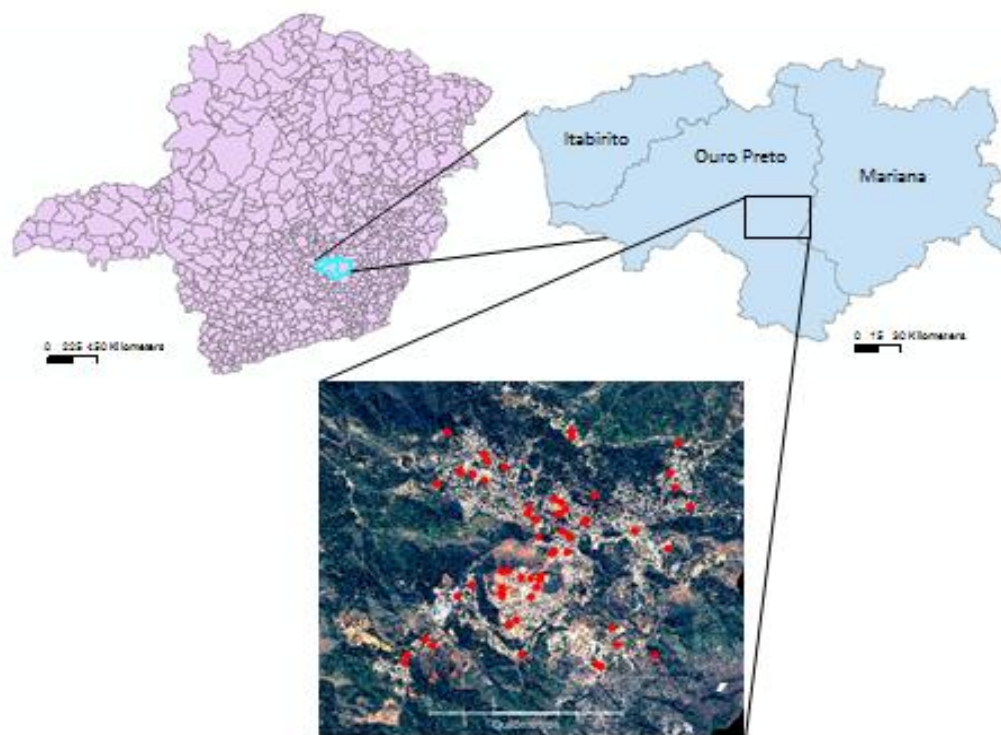
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A coleta das amostras de água, desde a seleção dos pontos até o procedimento de amostragem, foi realizada de acordo com as determinações da Vigilância Ambiental de cada município, em conformidade com a Portaria n.º 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde.

De setembro de 2014 a dezembro de 2015, foram coletadas 1185 amostras de água para consumo nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito. Os pontos de coleta selecionados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Mapa de localização dos municípios estudados (Ouro Preto, Mariana e Itabirito) e dos pontos de coleta das amostras de água.



Legenda: os pontos vermelhos são os locais onde foi realizado a coleta de amostras de água. As coletas foram realizadas pelos funcionários do VIGIAGUA. De cada ponto, foram coletados 100 mL de água, em recipiente de plástico transparente esterilizado. O material foi transportado sob refrigeração, acompanhado pelo respectivo termo de coleta de amostra (TCA), devidamente preenchido pelo responsável. A amostragem obedeceu aos seguintes requisitos de representatividade dos pontos de coleta no sistema de distribuição (reservatórios e rede), combinando critérios de abrangência espacial e pontos estratégicos, entendidos como: a) aqueles próximos a grande circulação de pessoas, como terminais rodoviários e terminais ferroviários, entre outros; b) edifícios que alberguem grupos populacionais de risco, tais como hospitais, creches e asilos; c) aqueles localizados em trechos vulneráveis do sistema de distribuição, como pontas de rede, pontos de queda de pressão, locais afetados por manobras, sujeitos à intermitência de abastecimento e reservatórios, entre outros e d) locais com notificações sistemáticas de agravos à saúde, tendo como possíveis causas os agentes de veiculação hídrica (Portaria n.º 2914).

Todas as amostras foram levadas para o LBTM (DECBI, ICEB), em convênio UFOP-FUNED (Fundação Ezequiel Dias), e processadas imediatamente. Estas atividades do LBTM fazem parte da Rede de Laboratórios supervisionados pela FUNED do Estado de Minas Gerais, como previsto no convênio UFOP-VIGIAGUA/Prefeituras de Ouro Preto, Mariana e Itabirito-FUNED. Os laudos das análises são emitidos pelo LBTM, via cadastro no Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), DATASUS, Ministério da Saúde. Em termos práticos, esse sistema confere confiabilidade e oficializa os dados gerados.

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO: PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E *E. coli*

A análise microbiológica da água foi realizada empregando-se o Colilert® (Westbrook, ME, EUA), método enzimático que utiliza a tecnologia de substrato definido, na UFOP. Esta técnica, considerada simples, rápida, acurada e de custo-benefício favorável, é recomendada pela legislação do Ministério da Saúde e indicada pelo padrão de análise americano, *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water* (APHA, 2012). A

metodologia é mundialmente aceita para a avaliação qualitativa de coliformes totais e *E. coli*, indicadores de contaminação microbiana. Os dados são parâmetros para a avaliação da potabilidade de água para consumo e sua investigação mensal em águas para consumo humano é recomendada pelo Ministério da Saúde.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*

Para isolamento das amostras bacterianas, uma alíquota de 10 µL das amostras de água que geraram resultado positivo em Colilert® (coliformes totais) foi inoculada em MacConkey Agar (MCK; HiMedia, Mumbai, India). As culturas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Todos os morfotipos isolados, sempre que possível, cinco colônias de cada morfotipo, foram cultivados em Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Sparks, MD, EUA), a 37 °C, por 24 h, para obtenção de cultura pura. A identificação das amostras isoladas foi realizada empregando-se o meio de Rugai modificado por Pessoa e Silva.

4.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *E. coli*

A extração de DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio, conforme protocolo estabelecido por (Fox *et al.*, 1994), com pequenas modificações. Assim, após cultivo em TSA, por 24 h, a 37 °C, as culturas bacterianas foram centrifugadas e os sedimentos obtidos dissolvidos em 100 µL de tampão STET [Sacarose (Inlab, São Paulo, SP, Brasil) 8%, Tris-HCl (Promega, Madison, WI, EUA) 50 mM, EDTA (Life, Gaithersburg, MD, EUA) 50 mM, Triton X-100 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) 0,1 %; pH 8,0]. Em seguida, foram adicionados 30 µL de SDS (Calbiochem) 10% e 10 µL de RNase A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,5 mg/mL. Após homogeneização, as suspensões foram incubadas por 1 h a 37 °C e, em seguida, foram adicionados 15 µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) a 10 mg/mL. O material foi, então, novamente homogeneizado e incubado a 37 °C *overnight*. Em seguida, após adição de 10 µL de NaCl (Sigma-Aldrich) 5 M e 30 µL de solução CTAB (Sigma-Aldrich) 5% p/v/NaCl 0,7 M, as soluções foram gentilmente agitadas e incubadas

por 10 min a 56 °C, em banho-maria. DNA foi extraído adicionando-se gentilmente à amostra 200 µL de fenol (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) (equilibrado em Tris-HCl 500 mM, pH 8,0) e 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguida de centrifugação, em baixa rotação, por 4 min. A fase superior foi removida e transferida para outro tubo. O procedimento foi repetido por cerca de três vezes e, então, na última etapa da extração, utilizou-se apenas clorofórmio. DNA foi, então, precipitado a -20 °C, *overnight*, pela adição de 30 µL de acetato de sódio (Sigma-Aldrich) e 400 µL de etanol absoluto (Merck). Após este período, as suspensões foram centrifugadas a 12000 g, por 75 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e foram acrescentados 400 µL de etanol 70%. As suspensões foram novamente centrifugadas a 12000 g, por 25 min, a 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e os tubos contendo as amostras de DNA mantidos abertos, vertidos sobre papel absorvente, para evaporação do etanol residual. O DNA foi solubilizado em 50 µL de água Milli-Q® (Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França) estéril. As amostras foram homogeneizadas, a concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro (Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA), empregando-se comprimento de onda de 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.

A caracterização das amostras de *E. coli* foi realizada por meio de reação de polimerização em cadeia (PCR), empregando-se, como alvo, os seguintes marcadores de patogenicidade: *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 amostras *eae*⁺ ou *eae*⁺/*bfpA*⁺ foram identificadas como EPEC, a presença de *elt* e/ou *est* identificava a amostra como ETEC, as amostras *stx1*⁺ e/ou *stx2*⁺ correspondem a STEC e quando *eae* foi simultaneamente detectado, a amostra foi identificada como EHEC.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 20 µL e o *mix* era 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 (Phoneutria) e 20 ng de DNA molde. Os *primers* e as condições de cada reação estão apresentados no Quadro 2.

Cerca de 4 µL dos produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (Sigma-Aldrich) 8% 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) e controle negativo interno (água) foram incluídos em cada lote de reação. Como padrão, foi utilizado o marcador de massa molecular 100 bp (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). O gel foi examinado sob luz ultravioleta.

4.5 ANÁLISE ESPACIAL DOS PONTOS DE ÁGUA CONTAMINADA COM *E. coli* NOS MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E, ITABIRITO

Os resultados obtidos no presente trabalho geraram um banco de dados geográficos mediante a utilização do Sistema Gerenciador de Banco de Dados PostgreSQL, produzindo um mapa digital pelo geoprocessamento dos dados de coleta. A utilização inédita desta ferramenta computacional para mapear pontos de contaminação das águas de abastecimento foi estabelecida pela Prof.a Maria Célia da Silva Lanna, em 2013, no Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica (LMBT), DECBI, ICEB, UFOP. Esta metodologia utiliza o *software* de geoprocessamento TerraView, que permite, também, realizar as análises estatísticas de Kernel. Este trabalho é realizado em parceria com o Prof. Tiago Carneiro, Coordenador do Laboratório de Simulação de Sistemas Terrestres - TerraLab/UFOP/INPE (www.terralab.ufop.br).

Os resultados obtidos, relativos a potabilidade e presença de patótipos diarreiogênicos de *E. coli*, são armazenados em um banco de dados geográficos construído a partir dos pontos referentes às coletas de amostras de água. O banco de dados gerado é de propriedade do LMBT, DECBI, ICEB, UFOP e foi disponibilizado para as Secretarias Municipais de Saúde de Ouro Preto, Mariana e Itabirito mediante contrato de transferência de *know-how* intermediado pelo NITE-UFOP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

De Setembro de 2014 a dezembro de 2015, foram coletadas 1185 amostras de água de pontos de distribuição, pelas Vigilâncias das Secretarias de Saúde dos Municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, em conformidade com a Portaria n.º2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde. A distribuição do número de amostras/município foi 512 para Ouro Preto, 320 para Mariana e 353 para Itabirito. Deve ser ressaltado que a maior parte das amostras é oriunda de escolas, creches e unidades de pronto atendimento, obedecendo aos requisitos de representatividade definidos pela Portaria em vigor.

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO: PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E *E. coli*

Um total de 92 (7,8%) de amostras de água apresentou resultado positivo para presença de coliformes totais e 49 (4,1%) para coliformes fecais. Em relação a cada município estudado, os resultados estão apresentados nos Gráficos 1, 2 e 3. As Tabelas 2, 3 e 4 informam a localização dos pontos de coleta positivos para coliformes totais e *E. coli* de cada município estudado e a época do ano em que a amostra foi coletada.

Os resultados demonstram que os municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito não atendem aos padrões microbiológicos de potabilidade de água de acordo com o Artigo 11 da Portaria n.º 518/2004, do Ministério da Saúde. Segundo o documento, o padrão microbiológico da água para consumo humano, incluindo fontes individuais, como poços, minas e nascentes,

deve ser ausência de *E. coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra (BRASIL, 2004).

Gráfico 1: Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* nas áreas urbana e rural do município de Ouro Preto/MG, entre junho/2014 e dezembro/2015.

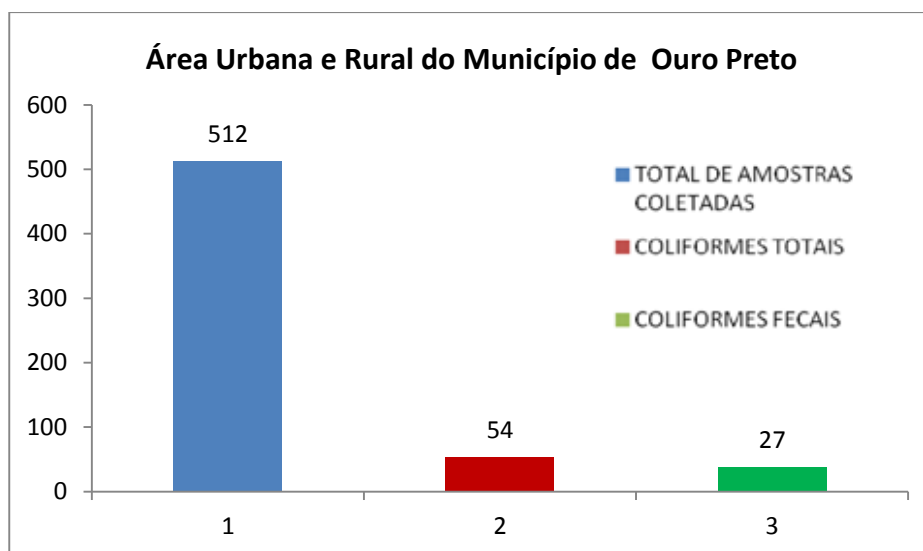


Tabela 1. Presença de *Escherichia coli*, localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais das áreas urbana e rural do município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.

Coliformes fecais	Local	Mês/ano de coleta
-	Estação de Tratamento de Água	Agosto/2014
+	Escola Municipal Raimundo Felicíssimo	Setembro/2014
+	Vila Aparecida	Setembro/2014
+	Escola Municipal Lavras Novas	Outubro/2014
+	Centro de Convergência/UFOP ¹	Novembro/2014
+	Prática Cirúrgica/UFOP	Novembro/2014
+	Escola de Direito, Turismo e Museologia/UFOP	Novembro/2014
-	Escola de Minas/UFOP	Novembro/2014
-	Escola de Farmácia/UFOP	Dezembro/2014
-	Bloco de Salas de Aula/UFOP	Dezembro/2014
-	Escola de Nutrição/UFOP	Dezembro/2014
-	Centro de Convenções	Dezembro/2014
+	Escola Municipal Alfredo Baeta	Janeiro/2015
+	Lar São Vicente de Paula	Janeiro/2015
-	Estação de Tratamento de Água	Janeiro/2015
+	Escola Municipal Adalmir Maia	Fevereiro/2015
-	Centro de Convenções	Março/2015
-	Creche Noêmia Veloso	Março/2015
+	Estação de Tratamento de Água	Março/2015
+	Unidade de Pronto Atendimento	Março/2015
-	Creche Naná Sete Câmara	Abril/2015
-	Escola Simão Lacerda	Maio/2015
+	Escola de Direito, Turismo e Museologia/UFOP	Julho/2015
-	Escola de Minas/UFOP	Julho/2015
+	Escola de Farmácia/UFOP	Agosto/2015
-	Bloco de Salas de Aula/UFOP	Agosto/2015
-	Escola de Nutrição/UFOP	Agosto/2015
-	Centro de Convenções	Setembro/2015
-	Restaurante Universitário/UFOP	Setembro/2015
+	Creche Cantinho da Criança	Setembro/2015
-	Vila Aparecida	Setembro/2015
-	Creche Alto da Beleza	Outubro/2015
-	Creche Noêmia Veloso	Outubro/2015
+	Creche Sonho de Criança	Outubro/2015
+	Vila Aparecida	Outubro/2015
+	Unidade de Pronto Atendimento	Outubro/2015
-	Escola de Direito, Turismo e Museologia/UFOP	Novembro/2015
+	Escola de Minas/UFOP	Novembro/2015
+	Escola de Farmácia/UFOP	Novembro/2015
+	Bloco de Salas de Aula/UFOP	Novembro/2015
+	Escola de Nutrição/UFOP	Novembro/2015
+	Capes	Dezembro/2015
-	Projeto Sorria	Dezembro/2015
+	Unidade Básica de saúde Antônio Pereira	Dezembro/2015
-	Escola de Nutrição/UFOP	Dezembro/2015
-	Escola de Farmácia/UFOP	Dezembro/2015
-	Escola de Minas/UFOP	Dezembro/2015
-	Unidade de Pronto Atendimento	Dezembro/2015
+	Creche Criança Feliz	Dezembro/2015
+	Escola Municipal Isaura Mendes	Dezembro/2015
+	Centro de atendimento á pessoas especiais	Dezembro/2015
+	Centro de Convergência	Dezembro/2015
-	Vila Aparecida	Dezembro/2015
-	Unidade de Pronto Atendimento	Dezembro/2015

Gráfico 2: Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* na área urbana do município de Mariana/MG, entre junho/2014 e dezembro/2015.

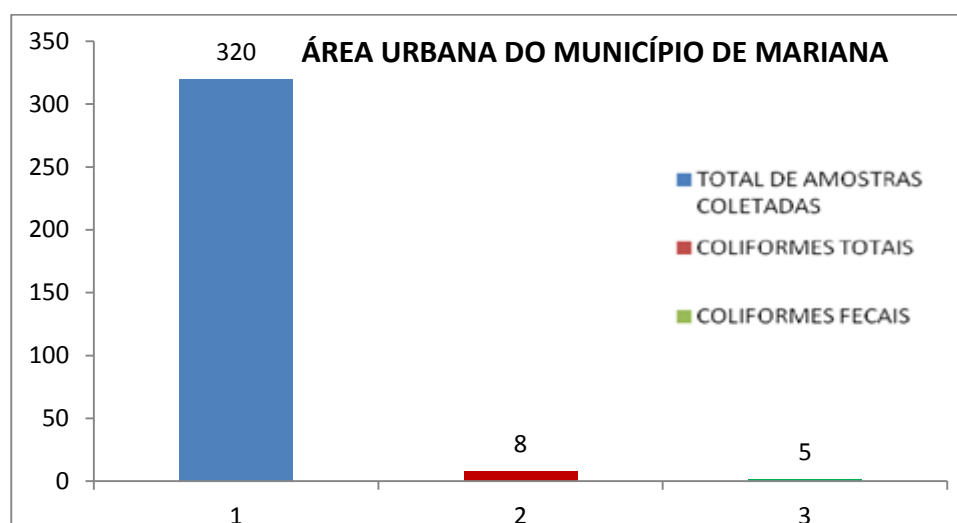


Tabela 2. Presença de *Escherichia coli*, localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais da área urbana do município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.

Coliformes fecais	Local	Mês/ano de coleta
+	Centro de Referência de Assistência Social Colina	Setembro/2014
+	Biblioteca Instituto de Ciências Humanas e Sociais/UFOP ¹	Outubro/2014
+	Instituto de Ciências Sociais Aplicadas/UFOP	Dezembro/2015
+	Escola Estadual Coronel Benjamim Guimarães	Fevereiro/2015
+	Biblioteca Instituto de Ciências Humanas e Sociais/UFOP	Março/2015
-	Terminal Rodoviário	Agosto/2015
-	Escola Municipal Passagem de Mariana	Novembro/2015
-	Arena Mariana	Novembro/2015

Gráfico 3: Amostras de água positivas para coliformes totais e *Escherichia coli* nas áreas urbana e rural do município de Itabirito/MG, entre junho/2014 e dezembro/2015.

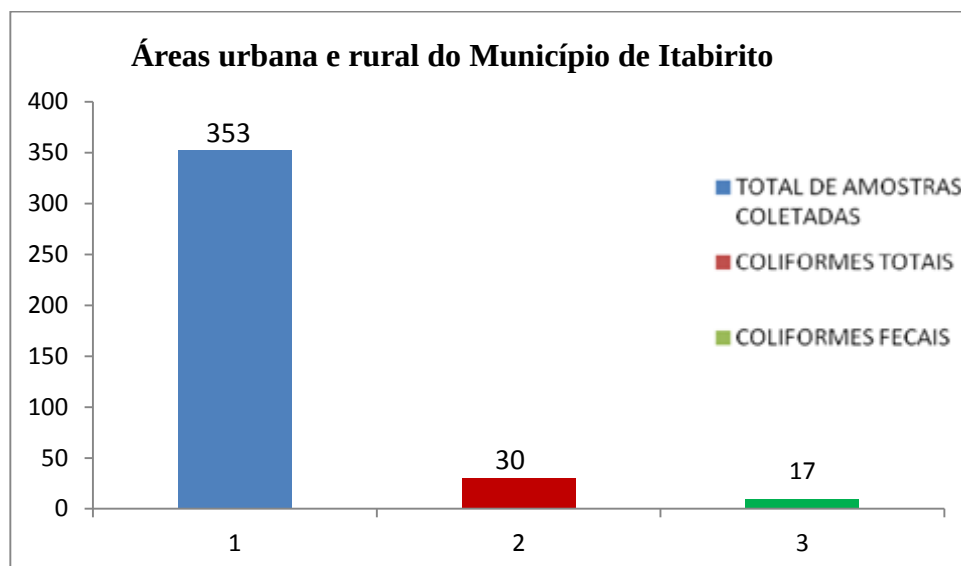


Tabela 3. Presença de *Escherichia coli*, localização e mês de coleta das amostras de água para consumo positivas para coliformes totais das áreas urbana e rural do município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro/2015.

Coliformes fecais	Local	Mês/ano de coleta
+	Unidade Básica de Saúde Central	Setembro/2014
+	Escola Padre Ferreira Bastos	Setembro/2014
+	Paina	Novembro/2014
+	Escola Padre Ferreira Bastos	Janeiro/2015
+	Escola Manoel Salvador de Oliveira	Fevereiro/2015
-	Casa Lar	Março/2015
-	Unidade Básica de Saúde Central	Maio/2015
-	Escola Estadual Engenheiro Queiroz Júnior	Junho/2015
-	Unidade Básica de Saúde Centro	Junho/2015
-	Unidade Básica de Saúde São José	Junho/2015
-	Escola São José	Julho/2015
-	Escola Dr. Raul Soares	Agosto/2015
-	Centro de Especialidades Odontológicas	Agosto/2015
-	Unidade Básica de Saúde Santa Rita	Agosto/2015
-	Escola Padre Ferreira Bastos	Setembro/2015
-	Centro de Referência de Assistência Social	Setembro/2015
+	Escola Municipal José Ferreira Bastos	Outubro/2015
+	Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora de Fátima	Outubro/2015
+	Residência Ana Lúcia	Outubro/2015
+	Centro Municipal de Educação Infantil Pequeno Polegar	Outubro/2015
+	Parque Ecológico	Outubro/2015
+	Casa da Vigilância em Saúde	Novembro/2015
+	Paina	Novembro/2015
+	Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora de Fátima	Dezembro/2015
+	Rodoviária Nova	Dezembro/2015
-	José Ferreira Bastos	Dezembro/2015
+	Centro Municipal de Educação Infantil Aquarela	Dezembro/2015
+	Centro de Recolhimento de Animais	Dezembro/2015
+	Paina	Dezembro/2015
-	Casa Lar	Dezembro/2015

Durante as últimas décadas, observou-se um incremento nos serviços de saneamento no Brasil, principalmente, em regiões metropolitanas. Porém, nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, vários problemas ainda são encontrados no que tange aos aspectos qualitativos e quantitativos do abastecimento de água. Uma parcela considerável da população é abastecida com água eventualmente impactada, são utilizadas fontes alternativas para o abastecimento de água e, em algumas áreas, ele ainda é deficiente. Estes grupos, muitas vezes apontados genericamente como carentes ou pobres, são socialmente identificáveis e espacialmente delimitáveis (Lana, 2011).

Além disso, a cloração inadequada da água no sistema de tratamento propicia a contaminação em momento posterior ao tratamento, ao longo da rede que leva a água até as residências, o que pode resultar na presença de coliformes na água. Ainda, a água que abastece a casa é, às vezes, mantida em rede de armazenamento inadequado, o que contribui para redução significativa de sua qualidade.

Os dados obtidos por meio de inquéritos epidemiológicos indicam que o saneamento básico em Ouro Preto, Mariana e Itabirito, na atualidade, deixam a desejar, pela frequência de amostras de água insatisfatórias observadas em escolas, creches, asilo, unidades de pronto atendimento (UPAs), postos de saúde, universidade e estações de tratamento de água (ETAs), que atendem número significativo de pessoas, de diferentes faixas etárias, em especial, crianças e idosos. Vale a pena ressaltar que as amostras de água coletadas de alguns pontos em diferentes épocas do ano apresentaram a presença de coliformes totais e *E. coli*, como, por exemplo, Vila Aparecida/Ouro Preto, Instituto de Ciências Humanas e Sociais - UFOP/Mariana e Paina/Itabirito. Este resultado é preocupante. O Instituto de Ciências Humanas e Sociais da UFOP recebe água filtrada e clorada, porém, a direção informou que jovens nadam na caixa d'água. Já na região de Paina, o ponto de coleta foi uma caixa d'água que recebe água tratada e abastece várias residências que ficam próximas.

No oeste de Bengal, na Índia, observou-se que, das 411 amostras de água para consumo estudadas, 129 (31%) apresentavam coliformes totais e em 88 (21,4%) detectou-se *E. coli*. A maior frequência de amostras positivas para coliformes totais e *E. coli* foi relatada para o período chuvoso (Batabyal *et al.*, 2013). Resultados semelhantes também foram reportados por Jatinder *et al.* (2013). Os autores coletaram amostras de seis locais diferentes em Brisbane, Austrália. As coletas foram realizadas antes e depois de tempestades e os

resultados mostraram um aumento significativo na quantidade de *E. coli* após o período chuvoso para todos os locais avaliados.

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*

No total, foram selecionadas, para o estudo, 907 colônias bacterianas. Todos os morfotipos isolados foram submetidos a identificação bioquímico-fisiológica. Ao final, 423 isolados foram identificadas como *E. coli*.

5.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *E. coli*

Os resultados relativos à detecção de patotipos diarreigênicos de *E. coli* estão apresentados na Tabela 4.

A água é um componente fundamental e salva-vidas. No entanto, uma parte considerável da população do mundo não tem acesso a fontes de água adequada e segura. Como resultado, doenças transmitidas pela água e a consequente mortalidade relacionada às mesmas continua a ser um fardo mundial, principalmente, em países em desenvolvimento (Ramteke *et al.*, 1994). No mundo em desenvolvimento, crianças e adultos sofrem episódios repetidos de doença diarreica infecciosa, onde a água é a principal fonte de exposição aos agentes diarreiogênicos (Sobsey *et al.*, 2003).

Tabela 4. Distribuição de EPEC, ETEC e EHEC em amostras de água para consumo de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.

Amostra	Patotipo de <i>Escherichia coli</i>	Município/Local	Mês/ano de coleta
4A2S	ETEC ¹	Ouro Preto/Vila Aparecida	Setembro/2014
4A1M	ETEC		
6A4S	ETEC		
6A5S	ETEC	Itabirito/Escola Padre Ferreira Bastos	Setembro/2014
6A1M	ETEC		
6A2M	ETEC		
13A4M	EPEC ²	Itabirito/Paina	Novembro/2014
25A3M	STEC ³	Itabirito/Paina	Fevereiro/2015
73A4S	STEC	Ouro Preto/Capes	Dezembro/2015
75A5M	STEC	Ouro Preto/Projeto Sorria Antônio Pereira	Dezembro /2015
81A4M	STEC	Ouro Preto/Unidade Básica de Saúde Antônio Pereira	Dezembro /2015
90A1S	EPEC ²	Ouro Preto/Centro de Convenções	Dezembro /2015

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* enterotoxigênica; ³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga.

A bactéria *E. coli* tem sido bastante estudada em diversas áreas, porém, o estudo dessa bactéria oriunda de fontes ambientais ainda é escasso, apesar de ser usada como indicadora de contaminação fecal. A pesquisa de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* em amostras isoladas de ambiente, principalmente de águas de abastecimento e consumo, são pouco relatados na literatura. No Brasil, segundo dados obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2014, *E. coli* foi responsável por 6,33% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos de 2000 a 2014.

Nove em cada dez mortes no Brasil são de crianças que vivem em regiões em desenvolvimento (Benício & Monteiro, 2000). Devido à grande importância da *E. coli* como agente de doença diarreica na população infantil, seus mecanismos de patogenicidade são frequentemente pesquisados e já bem compreendidos. Torna-se, portanto, relevante aplicar esse conhecimento às amostras de *E. coli* isoladas de água, confirmando seu potencial patogênico para seres humanos e outros animais.

A detecção de DEC é preocupante. STEC, por exemplo, foi observada na UPA do distrito rural de Antônio Pereira e na sede do Projeto Sorria, uma Unidade Odontológica de escovação dentária para prevenção da cárie dentária infantil, Centro de Atendimento a Pessoas Especiais no município de Ouro Preto e por último foi encontrado STEC também em Paina/Itabirito.

STEC (EHEC) é um patotipo de DEC associado a uma forma grave de doença diarreica. Em 1993, um dos primeiros surtos associados a óbitos envolvendo EHEC foi relatado nos Estados Unidos. O episódio acometeu mais de 700 indivíduos e culminou com a morte de quatro crianças. A fonte de infecção foi hambúrguer de carne bovina (Nataro & Kaper, 1998).

De fato, a principal fonte de contaminação por STEC é a carne bovina, pois o patotipo é prevalente no gado bovino. Nos Estados Unidos, o panorama entre 1982 e 2002 mostrava que a maioria dos surtos por STEC era relacionado a carne, leite não pasteurizado e derivados de origem animal contaminados com fezes de bovinos (Rangel *et al.*, 2005).

Apesar de, classicamente, STEC ser proveniente do gado bovino, nos últimos anos, entretanto, aumentou significativamente o número de surtos associados com outros veículos além da carne, particularmente as frutas, os sucos de frutas e os vegetais da produção orgânica. *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais comumente associado a surtos de colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), porém outros sorotipos de *E. coli* podem produzir toxina shiga e causar doença grave.

Garcia-Aljaro *et al.* (2005) detectaram amostras de STEC em efluentes, demonstrando a circulação ambiental desse patógeno. A observação de STEC no presente trabalho reforça a importância do ambiente aquático na rota de transmissão deste tipo diarreiogênico de *E. coli* e indica a necessidade de monitoramento ambiental eficiente para investigação da presença do organismo.

A detecção rápida e isolamento deste patógeno é de grande importância por razões de saúde pública (Verhaegen *et al.*, 2015). Recentemente, Peresi *et al.* (2015) conduziram um estudo com o objetivo de investigar a ocorrência de *E. coli* diarreiogênica em amostras de quibe cru. Setenta amostras foram recolhidas em estabelecimentos comerciais e as amostras identificadas como *E. coli* foram avaliadas por PCR. Os autores detectaram amostras portadoras de *stx1* sendo, portanto, classificadas como STEC.

EPEC foi relatada em água de consumo de Ouro Preto, similar a relato anterior de Ribeiro *et al.* (2011), mostrando sua persistência no ambiente local. Lanna (2003) reportou prevalência elevada de EPEC associada a óbito de crianças com idade inferior a cinco anos, também em Ouro Preto. A detecção do patótipo em instituições de ensino de Mariana e Itabirito é importante, inclusive, pelo número de pessoas expostas ao risco, principalmente, nas escolas de ensino primário de periferias, frequentadas por crianças, muitas vezes, em estado nutricional crítico.

Amostras de EPEC são consideradas como o patógeno entérico bacteriano mais frequentemente isolado de crianças abaixo de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento e responsável por cerca de 300 milhões de casos de diarreia e 380.000 mortes anualmente (Walk *et al.*, 2007). Recentemente, a importância do patótipo ganhou destaque em muitos países, sendo incluído na lista dos principais patógenos veiculados por água e alimentos pela frequência e periculosidade. A preocupação das autoridades referente ao microrganismo deve-se ao significativo índice de mortalidade associado à infecção pelo mesmo. A doença pode estar associada a uma perda maciça de líquidos, pela diarreia aquosa, à semelhança da sintomatologia grave da cólera, que conduz a casos fatais, principalmente, em crianças desnutridas. A bactéria é transmitida com facilidade, associando-se à diarreia do viajante (Crowe *et al.*, 2014; Horn *et al.*, 2015).

Titilawo *et al.* (2015) isolaram 300 amostras de *E. coli* de rios da Nigéria. Destas, 273 (91%) albergavam pelo menos um gene de virulência (de um a quatro genes). O subtipo patogênico EPEC foi o mais comumente detectado, observado em 46% de todas as amostras. Este resultado é preocupante, considerando o fato de que é o agente mais comum de diarreia do viajante, transmitida por meio de alimento e água contaminados. Vale ressaltar que os pontos nos quais foram detectadas as maiores incidências de *E. coli* apresentavam proximidade com múltiplas fontes de poluição fecal, tais como excrementos de seres humanos e outros animais, observados à margem dos rios onde foram coletadas as amostras (Titilawo *et al.*, 2015).

EPEC, por sua vez, foi observada no Centro de Convenções de Ouro Preto, local onde são realizados eventos diversos, como congressos, festivais e formaturas. O patótipo também foi detectado em um distrito de Itabirito, Paina, uma pequena região, com poucas pessoas, todas

abastecidas por uma única caixa d'água que recebe água tratada, a partir da qual ela é distribuída para a população.

Em estudo conduzido por Titilawo *et al.* (2015), EPEC foi considerada uma das principais causas de doença diarreica em crianças jovens. O gene *eae*, que codifica a intimina, foi o quarto mais prevalente no estudo (6%).

A ocorrência de amostras de DEC em águas ambientais está ligada à contaminação por fezes de animais domésticos e selvagens, assim como de seres humanos, escoamentos de terras agrícolas e de esgoto (Ishii *et al.*, 2007). Apesar da evidência crescente de que amostras de *E. coli* provenientes de fezes de seres humanos e de outros animais albergam diversos genes de virulência (Kaper *et al.*, 2004), apenas alguns estudos têm determinado a presença destes genes de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de água (Hamilton *et al.*, 2010). Os estudos de prevalência dos diversos patótipos de *E. coli* são importantes, uma vez que tem sido demonstrado que ela pode variar, sendo específica para cada região (Samie *et al.*, 2012).

Além disso, amostras bacterianas diarreiogênicas também podem ser transmitidas pelo consumo de vários tipos de alimentos, contato com animais e transmissão pessoa-pessoa (Smith *et al.*, 2015). Presentes nas fezes, podem contaminar águas de superfícies ou subterrâneas, bem como culturas de hortifrutigranjeiros, solo e produtos de origem animal, como produtos lácteos (queijo e leite cru).

A presença de EHEC, EPEC e ETEC tem sido relatada em aquíferos de água doce e estuários. No entanto, a distribuição de subtipos patogênicos de *E. coli* em água doce, especialmente após os eventos de tempestade, continua a ser relativamente desconhecido (Masters *et al.*, 2011).

No estudo de Batabyal *et al.* (2013), realizado Bengal, Índia, 9% (8/88) das amostras apresentaram resultado positivo para *E. coli*; 4,5% foram positivas para EPEC (*eae*) e 3,4% para ETEC (*elt* e *est*). Presença de *E. coli* diarreiogênica em fontes de água potável enfatiza a importância do papel da água na transmissão destes patógenos.

E. coli tem a capacidade de alterar sua constituição genética facilmente, frequentemente, por meio de transferência horizontal de genes (por ex. conjugação, transformação ou transdução). Por isso, as amostras de *E. coli* são tão diversas, podendo apresentar características que foram adquiridas de uma grande variedade de fontes. A água constitui-se em um meio facilitador para transferência gênica entre bactérias (Coura *et al.*, 2014).

O surto observado na Europa, em 2011, demonstra o fato, com clareza. Foram 2.987 casos de enterite aguda, 855 casos de síndrome hemolítica urêmica e 53 mortes. O agente, de acordo com relatório do Robert Kock Institute (2011), foi um *novo* patotipo de DEC, denominado *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina shiga (STEAEC), que mescla, como o nome indica, características de EAEC e EHEC. O organismo estava presente em broto de vegetais (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

5.5 DETECÇÃO DE PATÓGENOS OTIMIZADA VIA VIGILÂNCIA AMBIENTAL DOS MUNICÍPIOS

Os pesquisadores, em geral, relatam a dificuldade de detecção de patógenos no meio aquático por estarem dispersos e para aumentar as chances de detecção alguns apresentam metodologias especiais, principalmente, para a detecção de STEC. No presente trabalho, a estratégia para pesquisar os tipos diarreiogênicos de *E. coli* em amostras rotineiramente coletadas pelos setores de Vigilância Ambiental dos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito foi bem sucedida pelo maior número de amostras analisadas.

5.6 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA ABRANGÊNCIA DA AMOSTRAGEM EM ÁREAS URBANA E RURAL

É plausível supor que o índice mais elevado de amostras de água de abastecimento insatisfatórias e a detecção de DEC restrita às amostras coletadas em Ouro Preto e Itabirito possam ser explicados pela maior abrangência das coletas, incluindo áreas urbana e rural, realizadas, rotineiramente, pelas Vigilâncias desses municípios. Em Mariana, a coleta incluiu, apenas, a área urbana e amostras de água tratada. As áreas rurais, em geral, apresentam maior índice de amostras insatisfatórias (Nogueira *et al.*, 2003).

5.7 ANÁLISE ESPACIAL DOS PONTOS DE ÁGUA CONTAMINADA COM *E. coli* NOS MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E ITABIRITO

Com o objetivo de apoiar ações futuras (preventivas e corretivas) da Vigilância em Saúde dos Municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, foi realizado o geoprocessamento dos dados gerados, utilizando-se o programa TerraView e o Sistema Gerenciador de Banco de Dados PostgresSql. Análises estatísticas de Kernel permitiram a obtenção do cálculo de densidade. Com o geoprocessamento de todos os pontos de coleta, é possível verificar a distribuição espacial destes locais e, então, estruturar um banco de dados que possibilita consultas e identificação dos pontos onde há presença de coliformes fecal e total (Figuras 2 a 17). Isto permite a análise de modo espacial da situação da potabilidade da água para consumo nos municípios, permitindo que sejam traçadas futuras ações preventivas e corretivas.

A utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) tem sido mundialmente utilizada como importante suporte no âmbito da saúde pública, mas, no Brasil, ainda é incipiente (Ferreira & Raffo, 2012). Pela primeira vez, no nosso país, esta proposta é utilizada com o objetivo de realizar o geoprocessamento dos dados obtidos na avaliação da potabilidade de água e, principalmente, na detecção de patógenos importantes como os tipos diarreiogênicos de *E. coli*. A ferramenta será disponibilizada para a Vigilância em Saúde dos municípios incluídos no estudo, propiciando agilidade às suas ações e auxiliando o gestor na tomada de decisões mais precisas e, principalmente, como suporte para as análises de causa e efeito que envolvem os fatores ambientais e a saúde pública.

Além disso, este trabalho tem contribuído, também, para os estudos sobre a evolução dos marcos legais relativos ao saneamento no Brasil, que normatizam o serviço de abastecimento de água no município de Ouro Preto (Ramos, 2013). Outras contribuições, como fornecimento de dados referentes ao Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), estrutura e processo de tratamento, logística, e relatórios de controle e vigilância da qualidade da água fornecida à população também podem ser mencionados.

Os resultados contribuirão para a discussão dos dados obtidos junto às autarquias municipais responsáveis pelo processo de controle da qualidade da água para consumo humano, quais

sejam Serviço Municipal de Água e Esgoto - SEMAE (Ouro Preto), SAAE (Mariana), SAAE (Itabirito) e a vigilância em saúde ambiental dos municípios envolvidos.

Digno de nota são os resultados de potabilidade insatisfatórios e os tipos diarreio gênicos detectados de modo inédito nas águas de abastecimento em asilos, creches e escolas de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, de modo recorrente. Os resultados sinalizam a existência de condições favoráveis ao desenvolvimento de episódios de doença diarreica, sobretudo nas faixas etárias extremas (crianças e idosos), em decorrência da maior suscetibilidade das mesmas. Correlação semelhante foi observada por outros autores (Zmirou *et al.*, 1987; Nogueira *et al.*, 2003).

Vale ressaltar, ainda, que, nos locais de coleta onde amostras diarreio gênicas foram detectadas, houve grande quantidade de relatos verbais de ocorrência da doença. Como fatores de risco à saúde, foram considerados, por Barcellos *et al.* (1998), a dificuldade na obtenção de água pela ausência de rede de distribuição nas proximidades dos domicílios, a contaminação recorrente da água por bactérias do grupo coliforme, bem como a captação de água em mananciais locais, sem tratamento ou sujeito a contaminação eventual.

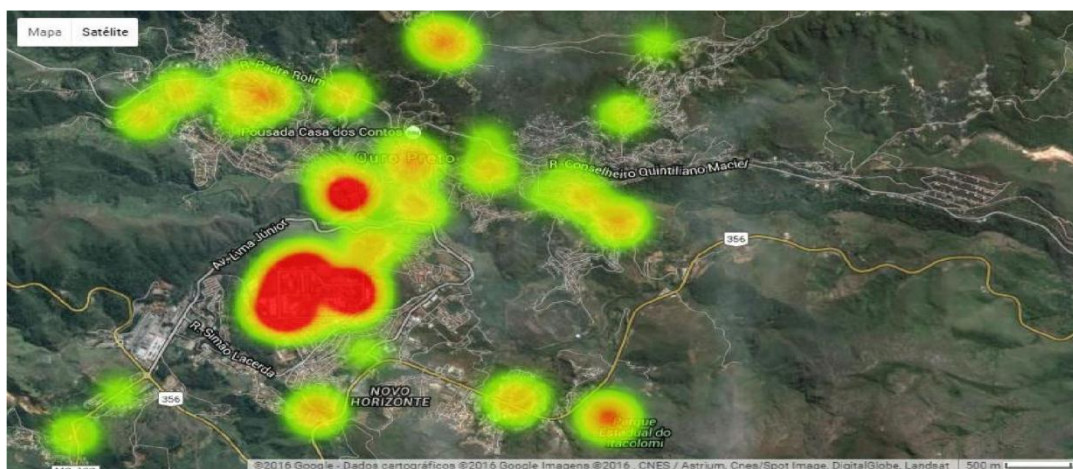
Situações como essas levaram a Organização Mundial da Saúde, revendo a extensão e gravidade do problema e os progressos científicos, a recomendar, há quase duas décadas, a execução de um programa com o objetivo de reduzir a morbidade decorrente de doenças diarreicas pela melhoria dos cuidados prestados às crianças, vigilância epidemiológica e qualificação de abastecimento de água (WHO, 1997). Relatos da recente epidemia na Europa mostram a importância das contaminações das águas de abastecimento na rota de transmissão de DEC, registrando, assim, a importância desta investigação em outras regiões brasileiras (CDC, 2013).

Figura 2. Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



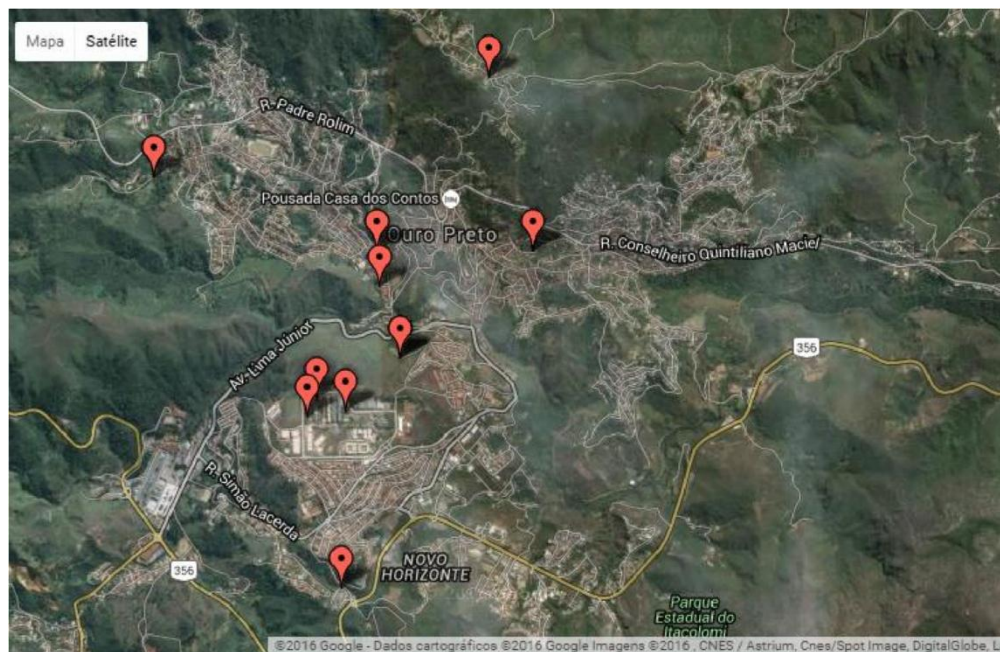
Legenda: Pontos em azul representa os locais de coleta das amostras de água.

Figura 3. Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



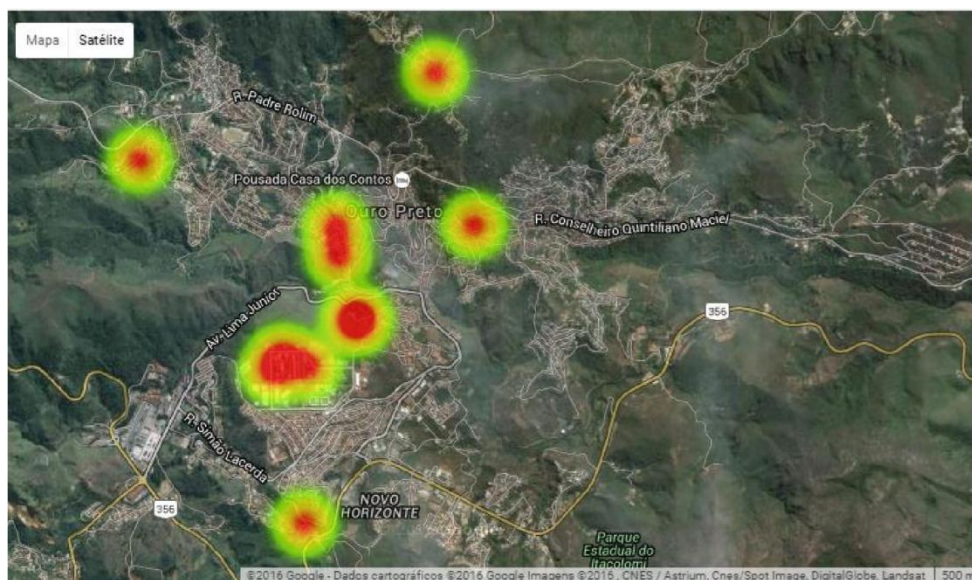
Legenda: As cores vermelho, amarelo e verde representa diminuição progressiva na coleta de amostras de água.

Figura 4. Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



Legenda: Pontos em laranja representa os locais de coleta das amostras de água que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e coliformes fecais.

Figura 5. Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



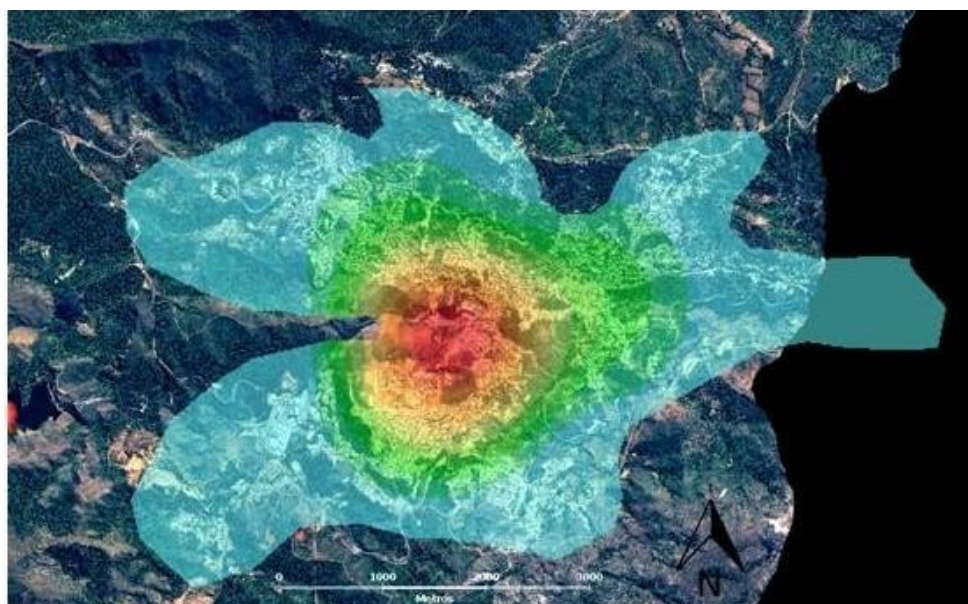
Legenda: As cores vermelho, amarelo e verde representa diminuição progressiva de amostras que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e fecais.

Figura 6. Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas para *E. coli* diarreiogênica no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



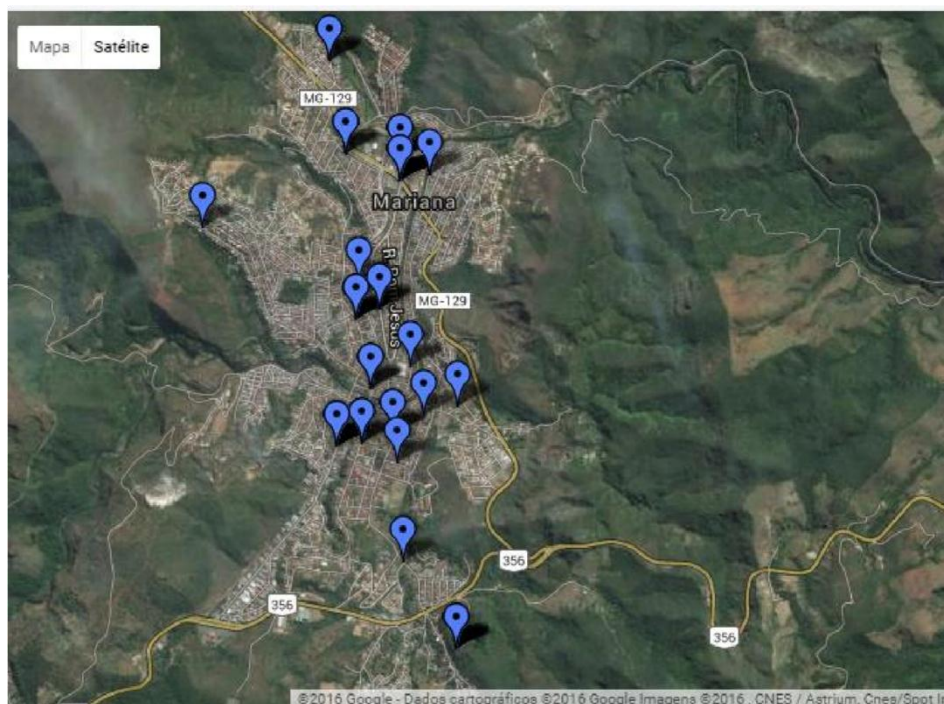
Legenda: Pontos em laranja representa os locais de coleta das amostras de água que apresentaram resultado positivo para *E. coli*.

Figura 7. Concentração das coletas de água positivas para *E. coli* diarreiogênica no município de Ouro Preto/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



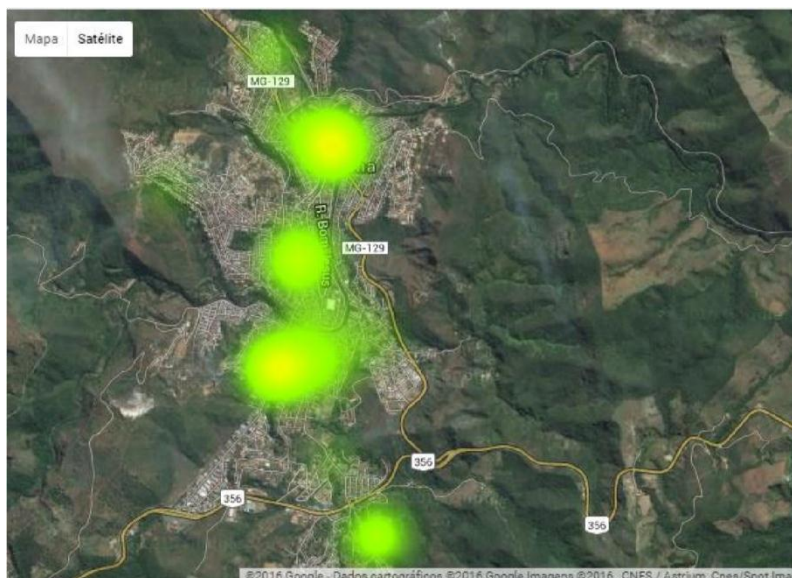
Legenda: As cores vermelho, amarelo e verde representa diminuição progressiva para as amostras de água que apresentaram resultado positivo para *E. coli* diarreiogênica.

Figura 8. Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



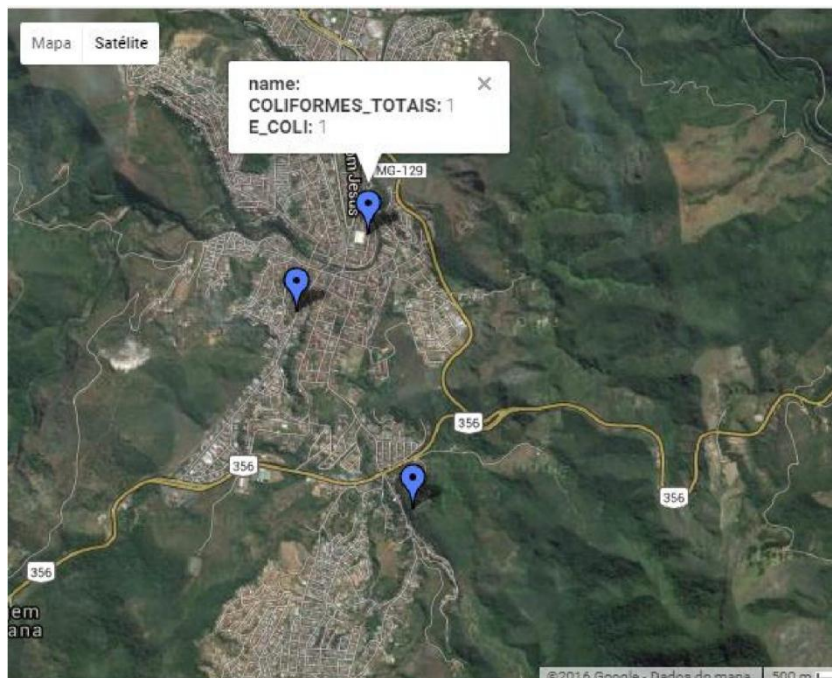
Legenda: Pontos em azul representa os locais de coleta das amostras de água.

Figura 9. Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



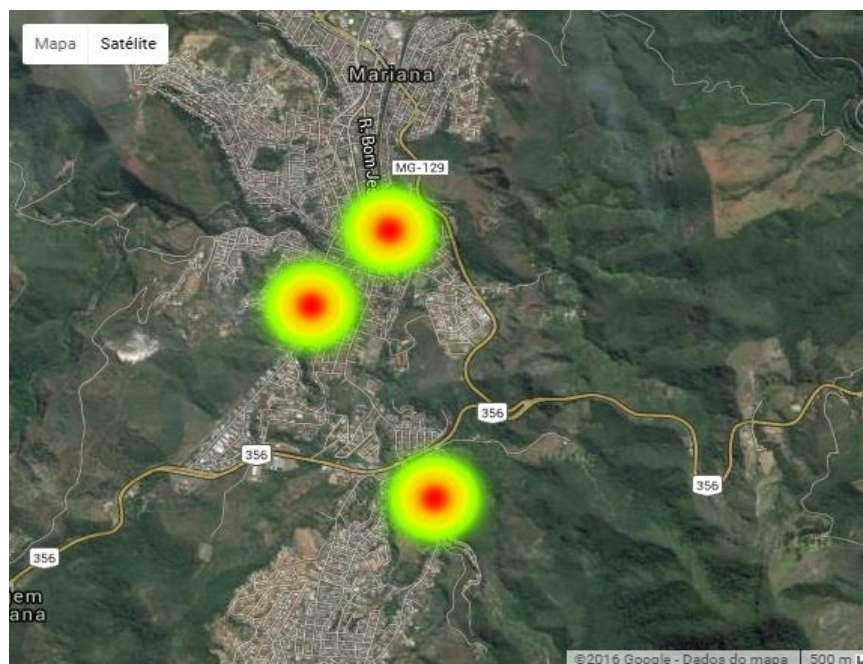
Legenda: As cores amarelo e verde representa diminuição progressiva na coleta de amostras de água.

Figura 10. Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



Legenda: Pontos em azul representa os locais de coleta de amostras de água que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e fecais.

Figura 11. Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



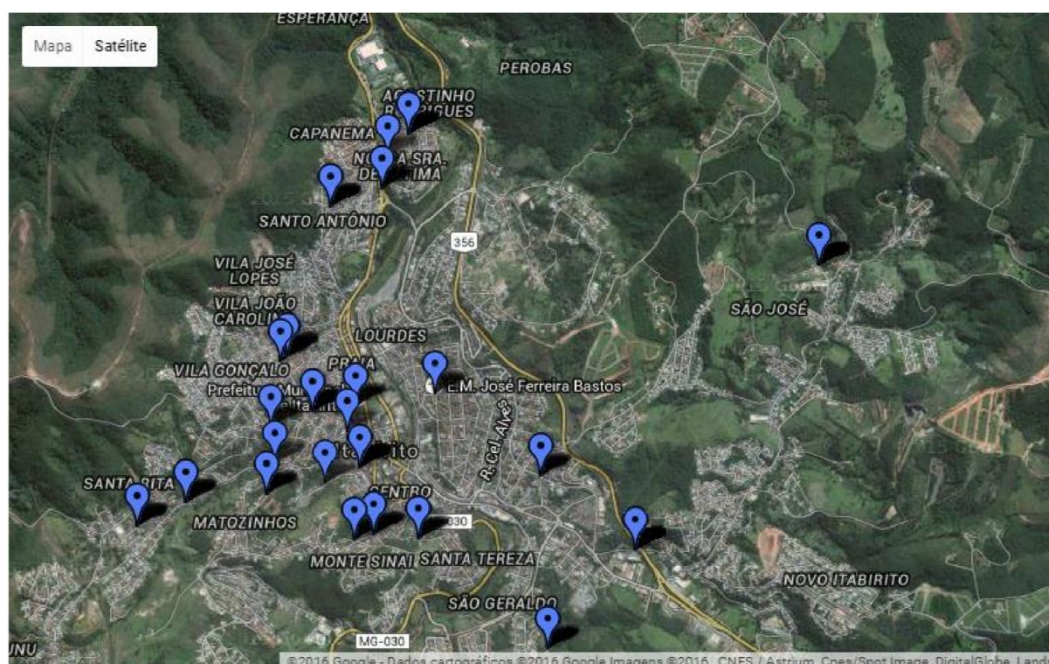
Legenda: As cores vermelho, amarelo e verde representa diminuição progressiva nas amostras de água que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e fecais.

Figura 12. Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas para *E. coli* diarreiogênica no município de Mariana/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



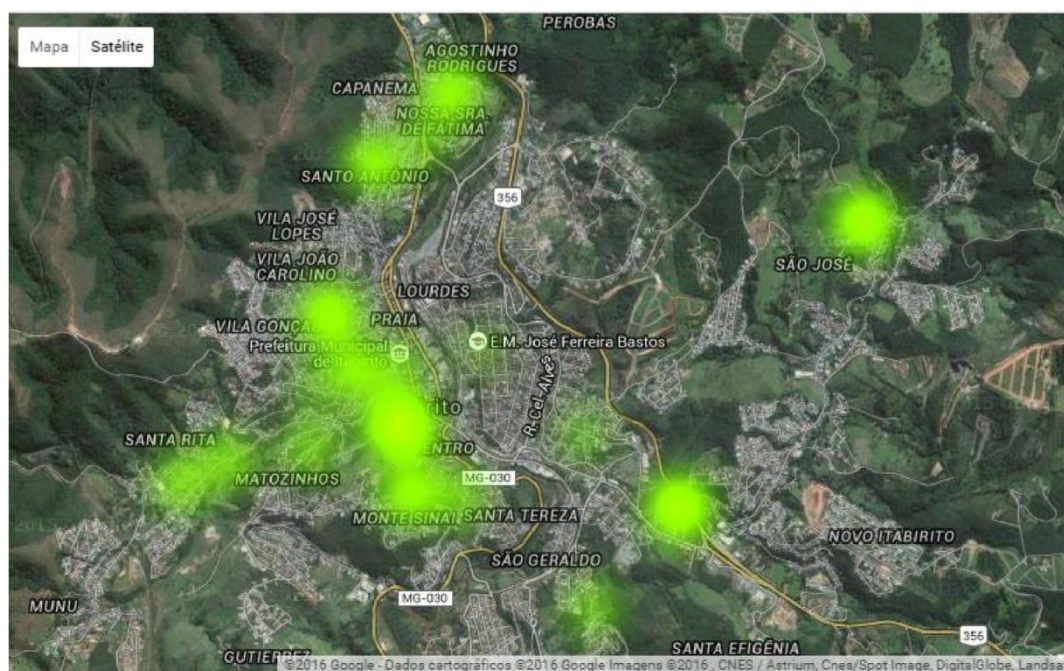
Legenda: Pontos em amarelo representa o local de coleta das amostras de água que apresentaram resultado positivo para *E. coli* diarreiogênica.

Figura 13. Distribuição espacial dos pontos de coleta de água no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



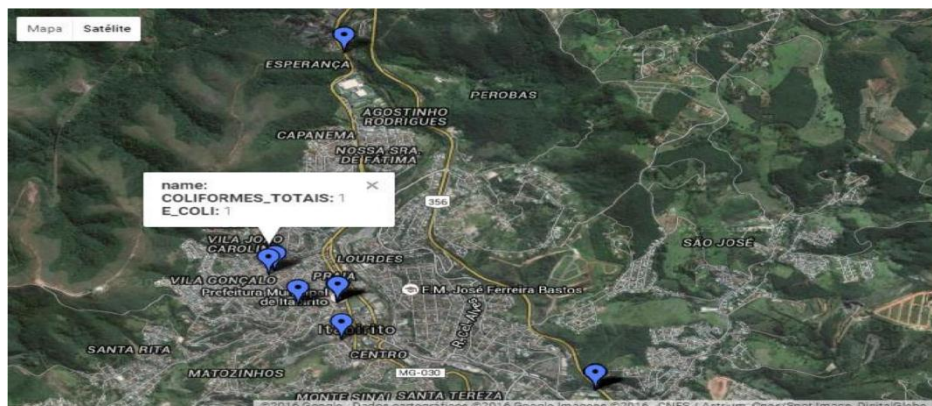
Legenda: Pontos em azul representa os locais de coleta das amostras de água.

Figura 14. Mapa de densidade das coletas de amostras de água para consumo no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



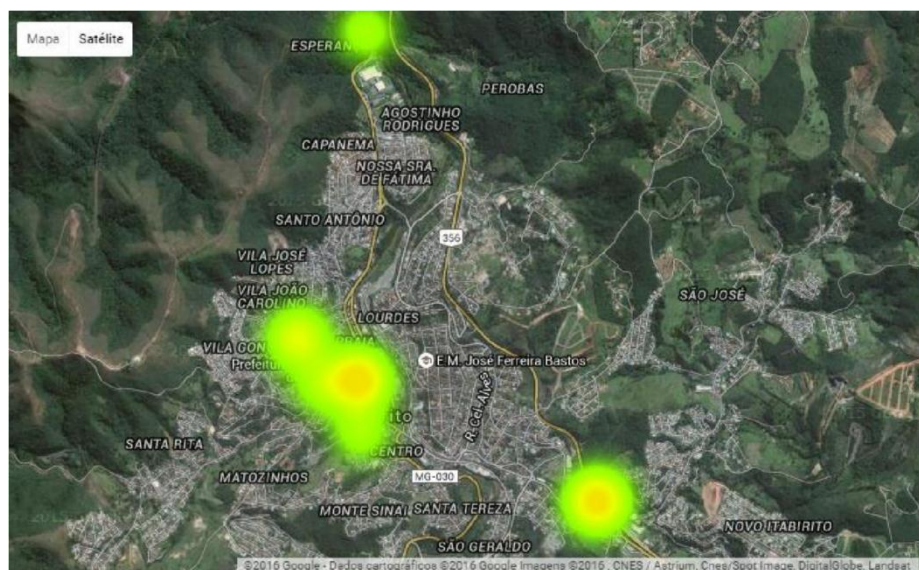
Legenda: As cores amarelo e verde representa diminuição progressiva na coleta de amostras de água.

Figura 15. Resultado da consulta ao banco de dados dos pontos de água para consumo positivos para coliformes totais e coliformes fecais no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



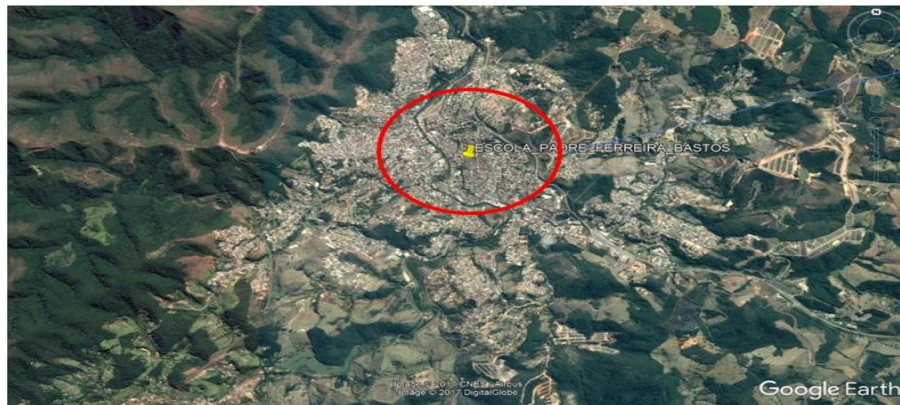
Legenda: Pontos em azul representa os locais de coleta das amostras de água que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e coliformes fecais.

Figura 16. Densidade de amostras de água para consumo positivas para coliformes totais e fecais no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



Legenda: As cores vermelho, amarelo e verde representa diminuição progressiva na coleta de amostras de água que apresentaram resultado positivo para coliformes totais e fecais.

Figura 17. Distribuição espacial das amostras de água para consumo positivas para *E. coli* diarreiogênica no município de Itabirito/MG, no período de junho de 2014 a dezembro de 2015.



Legenda: Pontos em amarelo representa o local de coleta das amostras de água que apresentaram resultado positivo para *E. coli* diarreiogênica.

6 CONCLUSÕES

O Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica (LMBT) do DECBI, ICEB, UFOP, desde 2013, faz parte da Rede de Laboratórios de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, supervisionada e auditada pela FUNED, participando, assim, do programa de descentralização das análises da qualidade microbiológica das águas do estado de Minas Gerais. No presente trabalho, que incluiu amostras obtidas em 2014 e 2015, pode-se constatar que a atuação do LMBT, com vistas à realização de análises de monitoramento de coliformes totais e fecais, contribuiu para o aumento do número de análises de água dos municípios incluídos no estudo e maior na rapidez na emissão dos laudos, imprescindível para as ações preventivas das Vigilâncias Municipais, contribuindo, assim, com o Plano de Fortalecimento de Vigilância em Saúde no Estado de Minas Gerais.

A investigação de patótipos diarreigênicos de *E. coli* e a utilização da ferramenta computacional de última geração na espacialização desses dados vêm proporcionando aos municípios participantes a oportunidade de otimizar o serviço de Vigilância Ambiental. Dessa forma, então, o presente trabalho agregou valor epidemiológico às análises rotineiras de qualidade microbiológica das águas de abastecimento dos municípios estudados. A partir de agora, mediante a constatação do risco detectado em determinados pontos à saúde da população, novos rumos poderão ser tomados, melhorando a eficiência da gestão municipal no controle e contenção das doenças diarreicas, frequentemente associadas aos patótipos diarreogênicos de *E. coli*.

A presença de DEC em amostras de água para consumo em Ouro Preto, Mariana e Itabirito ressalta a importância do controle das fontes de poluição fecal humana e animal, como também o gerenciamento de fontes de águas residuais municipais, para redução dos riscos potenciais para a saúde humana. Alguns dados obtidos confirmam relatos anteriores, em especial, para o município de Ouro Preto.

Admite-se que, entre os fatores determinantes da inadequação da água para consumo nos municípios estudados, no que se refere à qualidade microbiológica, destacam-se a falta de planejamento urbano, levando à superpopulação em áreas de risco, por construções

inadequadas, problemas de infraestrutura e presença de poços e fossas sépticas, à semelhança de registros em outros municípios brasileiros.

Assim, a pesquisa dos tipos diarreiogênicos de *E. coli* e o referenciamento dos locais onde a contaminação é detectada, como realizado nesta investigação, juntamente com as ações corretivas e preventivas do setor de vigilância ambiental, o apoio da população, mediante programas educativos, evitando a contaminação das minas e nascentes, podem ser modelo a ser aplicado em outros municípios brasileiros. Em conjunto, essas ações podem permitir o alcance da excelência no que se refere à qualidade de água para consumo, como observa-se nos países desenvolvidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.R.; Moss, M.O. Food Microbiology. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 490 p, 2008.
- Andrade, J.A.B., Haapalainen, E. F., e Fagundes-Neto, U. Escherichia coli entero agregativa Como Agente provocador de diarreia persistente: Modelo experimental utilizando microscopia Óptica de luz.Rev. paul. pediatr. [online]. , vol.29, 2011.
- APHA – American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association, Water Environment Federation 2017.
- APHA – American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association, Water Environment Federation 2012.
- Aranda, K. R.; Fagundes-Neto, U.; Scaletsky, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Journal of Clinical Microbiology, Washington DC, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.
- Ashraf S. M., Yunus M. 1997. Waterborne disease of bacterial origin in relation to quality of water in a suburb of Uttar Pradesh. *J. Biomed. Environ. Sci.*, **10**: 442-450.
- Barcellos, C., Monteiro A.M.V., Corvalán C., Gurgel, H.C., Carvalho M.S, Artaxo, P., Hacon, S., Ragoni, V., Climatic and environmental changes and their effect on infectious diseases: scenarios and uncertainties for Brazil, *Epidemiol. Serv. Saúde*: 18, (3), 2009.
- Barcelos C., Coutinho K., Pina M. E., Magalhães M. M. A. E., Paola J. C. M. D., Santos S. M. 1998. Inter-relacionamento de dados ambientais e de saúde: Análise de riscos à saúde aplicada ao abastecimento de água no Rio de Janeiro utilizando sistemas de informação geográfica. *Cad. de Saúde Pública*, **14** (3): 597-605.
- Banco Mundial. 2003. *Gerenciamento de Recursos Hídricos*.
- Banco Mundial. 2011. *Gerenciamento de Recursos Hídricos*.

- Batabyal, P., Mookerjee, S., Sur, D., Palit, A., 2013 Diarrheogenic *Escherichia coli* in potable water sources of West Bengal, India. *Acta Tropica*. V 127, Issue 3, P 153–157.
- Benicio M. H. D'A., Monteiro C. A. 2000. Tendência secular da doença diarreica na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev. Saúde Pública*, **34** (6 Supl): 83-90.
- Bernet-Camard, M.F., Coconnier, S., Hudault, S. Servin, A.L. Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cells lines. *Gut*. 38: 548-553,1996.
- Bilge, S.S., Clusen, C., Law, W., Moseley, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* 171: 4281-4289, 1989.
- Blanco, M.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Mora, A.; Prado, C.; Alonso, M. P.; Mouriño, M.; Madrid, C.; Balsalobre, C.; Juárez, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology*. Vol. 54: 309- 319, 1997.
- Bopp, C.A; Brenner, F. W.; Wells, J. G.; Strockbine, N.A. *Escherichia coli* and *Salmonella*. p. 459-465. In Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H.(ed) *Man. Clin. Microbiol.* ASM Press, Washington D.C, 1999.
- Borda, R.P. Figueredo, B. R., Cavalcante, J.A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Geociências Esc. Minas, Ouro Preto*, 57(1): 45-51, jan. mar. 2004.
- Branco S. M. 1999. Água, Meio Ambiente e Saúde. In: A. da C. Rebouças, Braga B., Tundisi J. G. 1999. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo, Instituto de Estudos Avançados da USP / Academia Brasileira de Ciências, 248-303.
- Bruni V., Maugeri T. L., Monticelli L. 1997. Faecal pollution indicators in the Terra Nova Bay (Rosa Sea, Antarctica). *Mar. Pollut. Bull.*, **11**: 908-912.
- Burn L. S., Silva D de, Shipton R. J. 2002. Effect of demand management and system operation on potable water infrastructure costs. *Urban Water*, **4**: 229-236.

- Caliman, M.C.W. Estudo De Vigilância Bacteriológica: Isolamento, Fatores De Virulência E Resistência Antimicrobiana De Cepas De Escherichia coli Isoladas De Gatos Domésticos Na Região De Ribeirão Preto. JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre, 2010.
- Camargo A., Capobianco J. P. R., Oliveira J. A. P. de. 2002. *Meio Ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós Rio-92*. São Paulo, Estação Liberdade, Instituto Socioambiental; Rio de Janeiro, Fundação Getúlio Vargas – Centro Internacional de Desenvolvimento Sustentável.
- Caras, I.W., Weddel, G.N., Davitz, M.A., Nessenzweig, V., Martin, D.W.Jr. Signal of attaching of a phospholipids membrane anchor in decay accelerating factor. **Science**. 238: 1280-1283, 1987.
- Centers for Disease Control and Prevention Outbreak of Escherichia coli O104:H4 infections associated with sprout consumption - Europe and North America, May-July 2011. *MMWR* 62:1029-1031, 2013.
- Coura, F.M.; Lage, A.P.; Heinemann Escherichia coli pathotypes associated with diarrhea in calves: an update *Pesq. Vet. Bras.* 9 (6); 1-12, 2014.
- Croxen, M.A, Law, R.J, Sholz, R. Keeney, K.M, Wlodarska, M., Finlay, B.B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. v.26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- Crowe, S.,J.; Mahon,B., E.; Vieira, A., R.; L.,Gould, H.,(2015) Vital Signs: Multistate Foodborne Outbreaks — United States, 2010–2014. *CDC Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC-MMWR)*. 64(43):1221-1225).
- D’Aguila P. S., Roque O. C. C., Miranda C. A. S., Ferreira A. P. 2000. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Cad. Saúde Pública*, **16** (30): 791-798.
- David P. R. de B. S., Mendes A. C. R., Neto A. de C., Costa S. M. S. 1999. Avaliação da Qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento de alguns pontos da cidade do Recife, PE. *Rev. Higiene Alimentar*, 13(60): 36-42.

- Echeverria, P., Serichantalerg, O., Changehawalit, S., Baudry, B., Levine, M.M., Oskov, F. Oskov, I. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *J. Infect. Dis.* 165, 141-143, 1992.
- Elliot, S.J., Wainwright, L., Macdaniel, T.K., Kaper, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28: 1-4, 1998.
- Formal, S.B., & Hornich, R.B. Invasive *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 137: 641-644, 1978.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos* United Kingdom, 419 Wiley-Blackwell, 2º ed., p.496, 2013.
- Finlay, B.B., Renshine, I., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B. Cytoesqueletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect. Immun.* 60: 2541-2543, 1992.
- Fischer W.C.L, Perin J, Aryee M.J, Boschi-Pinto C, Black R.E. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC Public Health.* 2012 Mar 21;12:220.
- Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo:Atheneu, 2008. 182p.
- Freitas M. B., Brilhante O. M., Almeida L. M. 2001. The importance of water testing for public health in two regions in Rio de Janeiro: a focus on fecal coliforms, nitrates and aluminum. *Cad. Saúde Pública*, 17(3): 651-660.
- Giombelli A., Rech H., Torres V. S. 1998. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da Região do Alto Uruguai Catarinense. *Rev. Higiene Alimentar*, 12(56): 49-51.
- Giron, J.A., Ho, A.S.Y., Schoolnik, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254: 710-713, 1991.
- Greenberg, D.E., Jiang, Z.D., Steffen, R. *et al.* Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 185: 944-949, 2002.

- Gunzburg, S. T.; Tornieporth, N. G.; Riley, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington DC, v. 33, n. 5, p.1375-1377, 1995.
- Hamilton M, Hadi AZ, Griffith F, Sadowsky MJ. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon bay, CA. *Water Res.* 44:5463-73, 2010.
- Hartland, E. L.; Leong, J. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution *Front Cell Infect Microbiol.* 3:15, 2013.
- Henderson, I.R. & Nataro, J.P. Virulence factors of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* 69: 1231-1243, 2001.
- Hoffmann F. L., Garcia-Cruz C. H., Vinturim T. M., Fazio M. L. S. 1997. Qualidade microbiológica da água consumida na cidade de São José do Rio Preto – SP. *Rev. Higiene Alimentar*, **11**(52): 47-49.
- Hoffmann, F. L. 1995. Estudo das características microbiológicas das águas do Rio Preto, no município de São José do Rio Preto – SP. *Rev. Higiene Alimentar*, **9** (36): 26-28.
- Horn, B., Lopez, L., Cressey, P. and Roos, R. Annual Report Concerning Foodborne Disease in New Zealand 2014, 2015: ESR Client Report FW15016, Christchurch, New Zealand.
- Huang, D.B. & Dupont, H.L. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. *Pediat. Infect. Dis.* 15: 266-271, 2004.
- Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ. Relationship between phylogenetic groups genotypic clusters and virulence genes profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5703–10.
- Jafari A, Aslani M. M, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J. Microbiol.* Sep;4 (3): 102-17, 2012.

- Jatinder P. S. S, Warish, A., Leonie, H., Simon, T., Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes in *Escherichia coli* Isolates from Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology* p. 328 –335. 2013.
- Johnson, J.R. & Stell, A.L. Extend virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with uropis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181:261-272, 2000.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.* 2: 123-140, 2004.
- Konowalchuk, J. Speirs, J. L., Stavrak, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichiacoli*. *Infect. Immun.* 18: 775-779, 1977.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:107-117, 2000.
- Lanna, M.C.S. Pesquisa de rotavírus e outros agentes associados as diarreias humanas no município de Ouro Preto, MG. Tese de Doutorado, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- Liu L, Johnson H.L, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn J.E. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379:2151-61, 2012.
- Lopez-pila J. M., Szewzyk R. Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. *Water Research*, **34**(17): 4195-4200, 2000.
- Masters N, Wiegand A, Ahmed W, Katouli M. 2011. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Res.* 45:6321–6333.
- Moura RA, et al – Clonal Relationship among a EPEC strains isolated from different animal species and humans. – *Applied and Environmental Microbiology*, n. 23(75), p. 7399-7408, 2009.

- Momba M. N. B., Kaleni P. 2002. Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Research*, **36**: 3023-3028.
 - Moraes D. S. L., Jordão B. Q. 2002. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Rev. Saúde Pública*, **36**(3): 370-374.
 - Mühldorfe, I., & Hacker, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbiol Pathogenesis*. 16: 171-181, 1994.
- Musa H. G., Shears P., Karl S., Elsabay S. K. 1999. Water quality and public health in northern Sudan: a study of rural and peri-urban communities. *J. Appl. Microbiol.*, **87**: 676-682.
- Nanan D., White F., Afsar H., Hozhabri S. 2003. Evaluation of a water, sanitation and hygiene education intervention on diarrhoea in northern Pakistan. *Bulletin of the World Health Organization*. **81**(3): 160-165.
- Nascimento, M.C., Goyatá, S.L.T., Chaves, E.C.L., Nogueira, D.A., 2013. Distribuição espacial dos idosos em situação de risco no contexto da estratégia saúde da família. Spatial distribution of elderly at risk situation in the context of family health strategy. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*. 9 (16): 115 – 120.
 - Nataro, J.P – Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. – *Curr Opin Gastroenterol*. n. 21, p. 4-8, 2005.
 - Nataro, J.P., Yikang, D., Giron, J.A., Savarino, S.J., Kothary, M.H., Hall, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlike plasmid regions. *Infect. Immun.* 61: 1126-1131, 1993.
 - Nataro, J.P. & Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201, 1998.
 - Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J.P. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli* *Infect. Immun.* 67 (5): 2184-2192, 1999.

- Neves, K.O. Qualidade microbiológica da água de abastecimento público e alternativo no Município de Ouro Preto, MG. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, 2003.
- Nogueira G., Nakamura C. V., Tognim M. C. B., Filho B. A. A., Dias B. P. F. 2003. Qualidade Microbiológica de Água Potável de Comunidades Urbanas e Rurais, Paraná. Rev. Saúde Pública. **37**(2): 232-236.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S., Moulds, J. The Dr hemagglutinin fimbrial adhesions AAF-I and AAF-II, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated Escherichia coli belong to a family of hemagglutinins with Drreceptor recognition. Infect. Immun. 58: 279-281, 1990.
- Ørskov, I., Wachsmuth, I. K., Taylor, D.N., Echeveria, P., Rowe, B., Sakazaki, R., Ørskov, F. Two new Escherichia coli O groups: O172 from “Shigella-like” toxin producing strain 73 (EHEC) and O173 from enteroinvasive E. coli (EIEC). Acta Pathol. Microbiol. immunol. Scand. 90: 30-32, 1991.
- Paton, A.J.C. & Paton, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clin. Microbiol. Rev. 11: 450-479, 1998.
- Peresi, J.T.M., Almeida, A.Z.C., Vaz, T.M.I., Hernandez, R.T., Teixeira, I.S.C., Silva, S.I.L., Graciano, R.A.S., Pinheiro, S.R., Santo, L.F. Search for diarrheagenic Escherichia coli in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. Food Control. V 63, Pag 165–170, 2015.
- Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000.
- Portaria nº Conama 357, de 17 de março de 2005.
- Puppi I. C. Importância do abastecimento de água. In: Netto J. M. de A., Martins J. A., Puppi I. C., Netto F. B., Franco P. N. C. *Planejamento de sistema de abastecimento de água*. Paraná, Universidade Federal do Paraná e Organização PanAmericana de Saúde, 5-20.1973.
- Ramos, A.M. Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano: Avanços e Desafios nos Municípios da SRS Belo Horizonte (2007-2012). IV Seminário Internacional de Engenharia de Saúde Pública da FUNASA, 2013.

- Ramteke,P.W., Pathak,S.P., Bhattacharjee,J.W., Gopal, K., Mathur, N., 1994.Evaluation of the presence–absence (P–A) test: a simplified bacteriological test for detecting coliforms in rural drinking water of India. V. 33 (1),pp. 53–59.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect.Dis.* v 11: 603-9, 2005.
- Reasoner D. J. *Agentes patógenos en el agua potable: Estado actual y perspectiva*. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. [online]. [citado 07 de Abril2003]. 25p 1998. Disponível em: <http://www.cepis.opsoms.org/bvsala/e/efultext/agentes/agentes.pdf>.
- Rebouças A. da C., Braga B., Tundisi J. G. 1999. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo, Instituto de Estudos Avançados da USP / Academia Brasileira de Ciências, Escrituras Editoras.
- Reid, S. D.; Betting, D. J.; Whittam, T. S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington DC, v. 37, n. 8, p. 2719-2722, 1999.
- Reis, V.W., Neves, K., Moreira, G.I.P., Souza, G.S.M.B, Ribeiro, D.A. , Niemann, F.S., Gatti, M.S.V.. , Tsuji, T. , Yano, T., Lanna, M.C.S. Antibiotic resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from drinking water in Ouro Preto, MG, Brazil.17 th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Epidemiology of waterborne diseases D-27, Florianópolis, SC, Brazil, 2013.
- Ribeiro, D.A., Niemann. F.S., Gatti, M.S.V., Lanna, M.C.S., Tsuji, T., Yano, T. Putative new heat-stable cytotoxic and enterotoxic factors in culture supernatant of *Escherichia coli* isolated from drinking water. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, volume, issue 1, pages 103-107, 2011.
- Rivera N. G., Martins M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. *Rev.Ciênc. Farm.*, **17**: 115-136, 1996.
- Robbins-Browne R. N. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.*, **9**: 28-53, 1987.

- Robert Koch Institute, 2011. Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak. Germany, 2011. 45 p.
 - Sabione J. G. Avaliação da Eficiência do Filtro de Areia na Redução Microbiana em Água de Consumo. *Rev. Higiene Alimentar*, 15(84): 75-78, 2001.
 - Samie A, Nkgau TF, Bessong PO, Obi CL, Dillingham R, Guerrant RL. *Escherichia coli* pathotypes among human immunodeficiency virus infected patients in the Limpopo Province. *Afr J Microbiol Res*. 2012;6:6022–30.
 - Sánchez, S.; Martínez, R.; Rey, J.; García, A.; Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; MORA, A.; Herrera-Léon, S.; Echeita, A.; Alonso, J. M. Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet. Microbiol.*, v. 142, p. 445-449, 2010.
 - Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., Levine, M.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* elaborate a wheat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87: 1450-1455, 1991.
 - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014.
- Smith, J. L., Fratamico, P.M. *Escherichiacoli* and Other Enterobacteriaceae: Food Poisoning and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*. Pag 539–544, 2015.
- Sobsey, M.D., Handzel, T., Venczel, L., 2003. Chlorination and safe storage of household drinking water in developing countries to reduce waterborne disease. *Water Sci. Technol.*, 47 (3) pp. 221–228.
 - Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K., Donnenberg, M.S. A cluster of fourteen genes from Enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient to biogenesis of type IV pilus. *Mol. Microbiol.* 20: 313-323, 1996.
 - Strauss B., King W., Ley A., Hoey J. R. A prospective study of rural drinking water quality and acute gastrointestinal illness. *BCM Public Health*, 1:8.2001.

- Taylor, J., Echeverria, P., Pal, T., Sethabutr, O., Saiborisuth, S., Srichamom, S., Rowe, B., Cross, J. The role of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. **J. Clin. Microbiol.** 26: 1362-1366, 1988.
 - Titilawo Y, Obi L, Okoh A. Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiology* 15:204, 2015.
 - Torres, A. G. - Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Betham Science ebooks. ISBN: 978-1-60805-192-2, 2010.
 - Trabulsi, L. R., Alterthum, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 760p.2008.
 - Tzipori, S., Montnaro, J., Robins-Browne, R.M., Vial, P., Gibson, R., Levine. M.M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect. Immun.* 60: 5302-5306, 1992.
 - Verhaegen, B., Van Damme, I., Heyndrickx, M., Botteldoorn, N., Elhadidy, M., Verstraete, K., Dierick, K., Denayer, S., Zutter^b, I.D., Reu, K.D. Evaluation of detection methods for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food. *International Journal of Food Microbiology* V 219, Pag 64–70, 2015.
 - Vidal, R.; Vidal, M.; Lagos, R.; Levine, M.; Prado, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington DC, v. 42, n. 4, p. 1787-1789, 2004.
- Walk ST, Alm EW, Clahoun LM, Mladonicky JM, Whittam TM. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol.* 9:2274–88, 2007.
- Walker CL, Black RE – Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents and adults – *Epidemiology Infect*, n. 138 (supl. 9), p. 1215-1226, 2010.
 - Welch P., David J., Clarke W., Trinidad A., Penner D., Bernstein S., McDougall L., Adesiyun A. A. Microbial quality of water in rural communities of Trinidad. *Pan American Journal of Public Health*, 8(3): 172-180, 2000.

World Health Organization/UNICEF. Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation, updated 2017.

- World Health Organization. Joint Monitoring Programme for water supply and Sanitation, updated 2013.
- World Health Organization. Guidelines for drinking water quality – Health criteria and othersupporting information. 2: Second ed. WHO. Geneva, 1997.
- Zmirou D., Ferley J. P., Collin J. F., Charrel M., Berlin J. A follow-up study of gastrointestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *American Journal of Public Health*, 77(5): 582-584, 1987.
- Xavier-Da-Silva, J. Geoprocessamento para Análise Ambiental. Rio de Janeiro: 228 p.2001.