

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/55601

IB/ 81997

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Variabilidade genética, grupos filogenéticos e
fatores de patogenicidade em *Escherichia coli*
isoladas de águas superficiais e destinadas ao
consumo humano no Estado de São Paulo**

Renato Hohl Orsi

Orientadora: Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Renato Hohl Orsi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Laura M. M. Ottoboni

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular, área de
concentração Genética de Microorganismos

Campinas, 2003

UNIDADE	IB/81997
Nº CHAMADA	Unicamp
	Or8v
V	EX
TOMBO SCI	5560.1
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00188612-2

31B ID 300662

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Or8v **Orsi, Renato Hohl**
 Variabilidade genética, grupos filogenéticos e fatores de patogenicidade em
Escherichia coli isoladas de águas superficiais e destinadas ao consumo
 humano
 no estado de São Paulo/Renato Hohl Orsi. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2003.

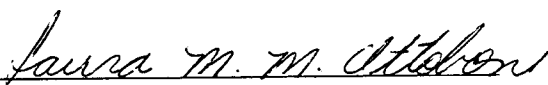
Orientadora: Laura M. M. Ottoboni
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Variabilidade. 3. Bactéria. I. Ottoboni, Laura M. M.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

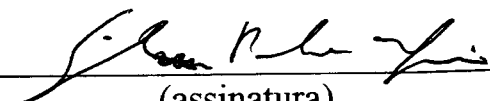
Data da Defesa: 30 de abril de 2003.

Banca Examinadora:

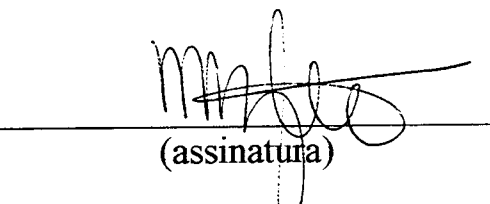
Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni
(Orientadora)


(assinatura)

Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio
(Titular)


(assinatura)

Dra. Maria Inês Zanoli Sato
(Titular)


(assinatura)

Prof. Dr. Paulo Inácio
de Knecht Lopez de Prado
(Suplente)

(assinatura)

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Cíntia, que sempre esteve presente, me apoiando, incentivando, aconselhando e me amando.

Ao meu filho Erick, a melhor coisa que eu já fiz na minha vida.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e respeitaram as minhas decisões.

Ao meu irmão por sempre ter sido o meu melhor amigo e me ajudado quando precisei do seu auxílio.

À família Hotta que me acolheu com carinho em seu convívio.

Aos meus amigos, sem os quais a vida não teria graça.

Ao pessoal do laboratório, que além de amigos foram colegas e muito me ajudaram nos anos em que convivemos.

À Dra. Laura, pela orientação e aprendizagem que obtive nestes anos em seu laboratório.

Aos professores que participaram da pré-banca, Dra. Tânia Gomes, Dr Gilson Paulo Manfio e Dr. Domingos da Silva Leite, pelas sugestões que propiciaram a melhoria deste trabalho.

À Dra. Maria Inês Z. Sato e ao Dr. Gilson Paulo Manfio, pelas participações na banca.

À Dra. Maria Inês Z. Sato pelo apoio na elaboração e realização deste projeto.

Ao Dr. Paulo Inácio de Knecht López de Prado pelo auxílio na análise dos dados.

Ao Dr. Gilson Paulo Manfio pela utilização do programa GelCompar para análise da variabilidade genética das linhagens de *E. coli*.

À Dra. Tânia Gomes e Dra. Mônica pela ajuda na realização dos experimentos de hibridação de colônias.

Ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), pelas ótimas condições de trabalho que proporcionaram a realização deste projeto.

À CETESB, pela coleta das amostras de água, isolamento e armazenamento das linhagens de *E. coli* utilizadas neste projeto.

Às Secretarias de pós-graduação do Instituto de Biologia e da Genética.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	vi
SUMMARY	viii
INTRODUÇÃO	1
1. <i>Escherichia coli</i>	1
2. <i>Escherichia coli</i> como agente etiológico de diversas doenças.....	1
3. <i>Escherichia coli</i> e água.....	4
4. Tipagem molecular.....	7
5. Grupos filogenéticos.....	9
6. Fatores de patogenicidade em <i>E. coli</i>	10
OBJETIVOS	12
CAPÍTULO 1. Determinação da variabilidade genética e fatores de patogenicidade de linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas nas represas Billings e Guarapiranga.....	14
CAPÍTULO 2. Análise dos grupos filogenéticos de linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba	48
CAPÍTULO 3. Análise da variabilidade genética, presença de fatores de patogenicidade e grupos filogenéticos em linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de águas destinadas ao consumo humano no Estado de São Paulo.....	59
CONCLUSÕES	75
BIBLIOGRAFIA	77

RESUMO

Escherichia coli está distribuída mundialmente e algumas linhagens podem causar uma grande variedade de doenças, incluindo diarreia, disenteria, síndrome hemolítica-urêmica, infecções de bexiga e rim e septicemia. *E. coli* é frequentemente encontrada em ambientes aquáticos, indicando risco de veiculação hídrica de doenças. Porém, sua ocorrência nestes ambientes é pouco estudada. Neste projeto, foram estudadas 133 linhagens de *E. coli* isoladas pela CETESB a partir de amostras de água das represas Billings (65) e Guarapiranga (68), 68 linhagens isoladas no rio Sorocaba e 60 no Jaguari, 49 linhagens isoladas a partir de água de consumo humano e 11 linhagens isoladas de animais. A variabilidade genética das linhagens isoladas nas represas e de 19 linhagens isoladas em água de consumo humano foi analisada através das técnicas de tipagem molecular BOX-, ERIC- e REP-PCR. A ocorrência de 10 seqüências referentes à fatores de patogenicidade (*bundle-forming pilus*, fator de aderência de EPEC, gene codificador da intimina, gene da toxina Shiga-1, gene da toxina Shiga-2, fator de invasão de EIEC, gene da enterotoxina termo-lábil do tipo I, gene da enterotoxina termo-estável de origem humana, gene da enterotoxina termo-estável de origem suína e plasmídeo de aderência de EAEC) foi determinada através de experimentos de hibridação de colônias, utilizando sondas específicas para os fatores de virulência. A determinação do grupo filogenético de todas as linhagens foi realizada através da detecção dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento TSPE4.C2 por PCR. Dentre as 152 linhagens analisadas, 6 apresentaram seqüências do plasmídeo de aderência de EAEC, 2 do gene codificador da intimina, 2 do gene codificador da enterotoxina termo-lábil do tipo I e 1 do gene da toxina Shiga-2, indicando que estas linhagens possuem potencial para causar doenças em humanos e animais. As análises de tipagem molecular indicaram que há diferença significativa ($p = 0,026$) entre as linhagens isoladas na represa Billings com relação às isoladas na represa Guarapiranga, enquanto que a análise dos grupos filogenéticos sugere que a contaminação por *E. coli* na represa Billings é principalmente de origem humana, e na represa Guarapiranga a contaminação predominante parece ser de origem animal.

Quanto às linhagens isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba, estas não diferem entre si no que se refere à freqüência dos grupos filogenéticos. Contudo, há diferença significativa ($p = 0,0305$) entre as linhagens isoladas nos rios e as linhagens isoladas nas represas. A

baixa proporção de linhagens pertencentes ao grupo B2, nos rios, sugere que a principal fonte de contaminação nestas águas seja animal e não humana. Observou-se variação sazonal ($p < 0,025$) nas proporções dos grupos filogenéticos das linhagens coletadas nos dois rios, a qual foi semelhante nos dois ambientes.

As linhagens isoladas a partir de água de consumo humano apresentaram uma grande variabilidade genética, indicando a existência de diversos focos de contaminação nestas águas. Nenhuma das 19 linhagens analisadas apresentou os genes de virulências estudados. A análise dos grupos filogenéticos de 49 linhagens mostrou predominância de grupos filogenéticos distintos nos diferentes tipos de água estudados (nascente, mineral, de poço e tratada) e uma grande proporção de linhagens pertencentes aos grupos D e B2 (~30%), geralmente patogênicas.

SUMMARY

Escherichia coli is a worldwide distributed bacteria species that can cause a wide variety of diseases including diarrhea, dysentery, hemolytic uremic syndrome, cystitis, pyelonephritis and septicemia. *E. coli* is often found in aquatic environments, where it can cause enteric waterborne diseases. There is a great number of information about the isolation of pathogenic *E. coli* from humans and animals. However, its occurrence in the environment is less studied. In this project, *E. coli* strains isolated from water samples by CETESB were used. The strains were isolated from the reservoirs Billings (65 strains) and Guarapiranga (68 strains); the rivers Sorocaba (68) and Jaguari (60); from drinking water (49) and animals (11). The genetic variability of the strains isolated from the reservoirs, of 19 strains isolated from drinking water and 11 strains isolated from animals were analyzed by means of the molecular typing techniques BOX-, ERIC- and REP-PCR. The pathogenic potential of the strains was determined by colony blot hibridization using 10 specific probes for sequences of virulence factors (bundle-forming pilus, adherence factor of EPEC, intimin gene, Shiga-1 toxin gene, Shiga-2 toxin gene, invasion factor of EIEC, heat-labile toxin 1 gene, heat stable toxin of human origin, heat stable toxin of porcine origin and adherence plasmid of EAEC). The determination of the phylogenetic group of all strains was carried out by PCR amplification of the genes *chuA* and *yjaA* and the fragment TSPE4.C2. Among the 152 strains analyzed, 6 showed sequences of the adherence plasmid of EAEC, 2 of the intimin gene, 2 of the heat-labile toxin 1 gene and 1 of the Shiga-2 toxin,, indicating that these strains have a potential to cause diseases in humans and animals. A significant difference ($p = 0,026$) among the strains isolated from the Billings reservoir and those isolated from the Guarapiranga reservoir was observed. The phylogenetic groups analysis suggested that the contamination by *E. coli* in the Billings reservoir is mainly of human origin and in the Guarapiranga reservoir it is predominantly of animal origin.

No significant difference was observed in the frequency of strains on the phylogenetic groups when the strains isolated from the Sorocaba and the Jaguari river were compared. However, a significant difference ($p = 0,0305$) was observed among the strains isolated from the rivers and the ones isolated from the reservoirs. The low proportion of

strains belonging to the B2 group in the rivers suggests that the main source of contamination in this water came from animal sources and not human. A significant difference ($p < 0,025$) in the proportion of phylogenetic groups was observed between the strains isolated in different months, in both rivers, indicating the existence of seasonal variation.

The strains isolated from drinking water showed a great genetic variability indicating the existence of many contamination sources in this water. None of the 19 strains analyzed showed the virulence genes that were investigated in the colony blot experiments. Analysis of the distribution of 49 strains in the phylogenetic groups showed that different groups predominate in the different types of water studied (springwater, mineral water, well and treated water). A great proportion of strains belonging to groups D and B2 (~30%), often pathogenic, was observed.

INTRODUÇÃO

1. *Escherichia coli*

Bacterium coli foi descrita no século XIX por Theodore Escherich (1855) em fezes humanas, onde ocorria em altas densidades e estava frequentemente associada ao bacilo da febre tifóide. No início do século passado (1912), já era utilizada como indicador da qualidade sanitária da água. Na década de 50, passou a ser denominada *Escherichia coli* e foi escolhida pelos cientistas como modelo para estudos de processos biológicos básicos, tais como vias metabólicas, regulação gênica, transdução de sinais, estrutura de parede celular e conjugação (Kuhnert *et al.*, 2000). Apesar de sua importância como agente etiológico de doenças animais e humanas, até recentemente, poucos laboratórios estudavam *E. coli* como um patógeno, apesar desta bactéria infectar milhões de pessoas em todo o mundo anualmente (Kuhnert *et al.*, 2000).

E. coli é um dos principais componentes dentre as Enterobacteriaceas da microbiota intestinal de humanos e animais (Kuhnert *et al.*, 2000). Estes microrganismos são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e se movimentam usualmente através de flagelos peritríquios. O genoma da bactéria varia de 2,3 a 3,0 x 10⁹ daltons, o conteúdo de G + C fica entre 49 e 52% (Brenner & Falkow, 1971; Brenner, 1981, 1983; Hartl & Dykhuizen, 1984) e o número total de genes codificadores de proteínas é 4228 na linhagem K-12 (Blattner *et al.*, 1997).

2. *Escherichia coli* como agente etiológico de diversas doenças

A maioria das linhagens de *E. coli* são comensais, porém, algumas linhagens podem causar uma variedade surpreendente de doenças, incluindo diarreia, disenteria, síndrome hemolítica-urêmica, infecções de bexiga e rim, septicemia, pneumonia e meningite (Saylers & Whitt, 1994; Gilligan, 1999). As linhagens patogênicas podem ser agrupadas em 6 categorias diferentes de acordo com os mecanismos de virulência que causam doenças: *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e *E.*

coli verotoxigênica (VTEC) (Saylers & Whitt, 1994; González *et al.*, 1997; Gilligan, 1999; Johnson & Russo, 2002). Essa versatilidade tem sido associada ao fato de diferentes linhagens de *E. coli* terem adquirido diferentes genes de virulência (Saylers & Whitt, 1994; Kuhnert *et al.*, 2000). Estima-se que 10-20% da informação genética encontrada em uma *E. coli* patogênica não está presente na linhagem K-12, não patogênica (Kuhnert *et al.*, 2000).

O estudo da virulência da *E. coli* tem sido mais concentrado nas doenças do trato urinário e principalmente nas doenças intestinais (Savageau, 1983; Henry *et al.*, 1998; Garcia-Rodriguez, 1998), pois algumas dessas bactérias estão associadas em maior ou menor grau com a diarreia humana, principalmente a diarreia infantil, e conseqüentemente têm um papel importante na mortalidade infantil nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (World Health Organization, 1995; González *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1997; Yamashiro *et al.*, 1998; Gilligan, 1999).

Desde 1945, quando foi verificado o primeiro caso de diarreia associada a uma linhagem específica de *E. coli*, o conhecimento a respeito de como esta bactéria causa a diarreia tem aumentado muito (Gilligan, 1999). Como todos os organismos que causam diarreia, as *E. coli* são ingeridas através de alimentos e águas contaminados com fezes humanas ou de animais (Gilligan, 1999). Os mecanismos de patogenicidade de *E. coli* são complexos e envolvem um grande número de fatores de virulência, que variam nas diferentes categorias (Gilligan, 1999). Muitos destes fatores de virulência parecem ter sido obtidos de outros patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* (Gilligan, 1999). *E. coli* é um excelente exemplo de que são os genes de virulência que um organismo carrega que o torna patogênico e não a designação de espécie ou gênero (Saylers *et al.*, 1994). Toxinas e fatores de adesão são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli*. Algumas toxinas são intimamente relacionadas com determinadas categorias desta bactéria (Kuhnert *et al.*, 2000).

Os principais fatores de virulência das EIEC são as proteínas invasivas. As *E. coli* desta categoria são mais freqüentes em países subdesenvolvidos e são adquiridas principalmente através de alimentos e água contaminados (Kuhnert *et al.*, 2000). As EIEC podem causar inflamação localizada, ulceração e diarreia. Alguns pacientes apresentam diarreia com dor abdominal, febre, perda de sangue, sendo que a maioria desenvolve apenas uma diarreia líquida.

As ETEC produzem dois fatores de virulência principais, adesinas e enterotoxinas, ambos codificados por plasmídios. Existem diversos grupos de adesinas (Nataro & Kaper, 1998), sendo que uma mesma linhagem pode produzir mais do que um grupo (Gilligan, 1999). As enterotoxinas são de 2 tipos: enterotoxinas termo-lábeis (LT I e II), que causam o aumento da concentração de AMPc dentro das células, levando à secreção ativa de íons cloreto e bloqueio da absorção do íon sódio; e enterotoxinas termo-estáveis (ST I e II). A ST-I leva ao acúmulo de GMPc, fazendo com que a célula perca água e eletrólitos (principalmente íons cloreto). Já a ST-II, causa um aumento na secreção de bicarbonato e água através de mecanismos ainda não totalmente conhecidos (Gilligan, 1999; Kuhnert *et al.*, 2000). Uma mesma linhagem pode produzir os dois tipos de enterotoxinas. A ETEC manifesta-se clinicamente através da diarreia líquida sem sangue, vômito, náuseas e ausência de febre (Gilligan, 1999; Kuhnert *et al.*, 2000) e é considerada a principal causa de diarreia em países em desenvolvimento (Kuhnert *et al.*, 2000), podendo ser fatal em crianças pequenas, devido à desidratação profunda (Gilligan, 1999).

A VTEC (também conhecida por STEC, de *Shiga toxin-producing E. coli* ou EHEC de *E. coli* enterohemorrágica) causa, inicialmente, uma diarreia líquida. Durante as primeiras 24 a 48 horas, a dor intestinal aumenta e geralmente a diarreia passa a conter sangue. Aproximadamente 10% das crianças infectadas desenvolvem a síndrome hemolítica-urêmica. As infecções por VTEC são típicas de países desenvolvidos e ocorrem, principalmente, através de alimentos contaminados (Kuhnert *et al.*, 2000). Os principais fatores de virulência das VTEC são: (1) intimina, codificada por um gene localizado em uma ilha de patogenidade no cromossomo da bactéria e responsável pela aderência da bactéria à mucosa intestinal, e (2) duas formas diferentes da toxina Shiga, Stx-1 e Stx-2, que agem inibindo a síntese protéica através do bloqueio do terminal aminoacil do RNAt ao ribossomo (Kuhnert *et al.*, 2000). As duas toxinas Shiga são provavelmente os principais fatores de virulência destes organismos (Gilligan, 1999).

As EPEC representam uma outra grande causa de diarreia em países subdesenvolvidos, onde afetam, geralmente, crianças menores de dois anos (Kuhnert *et al.*, 2000). Os sintomas são geralmente severos: diarreia líquida constante, vômito e febre (Kuhnert *et al.*, 2000). O principal fator de virulência produzido pela EPEC é a intimina. O modelo de patogenidade de EPEC pode ser dividido em três passos: aderência localizada,

mediada pelo BFP (“*bundle-forming pilus*”); transdução de sinal; e aderência íntima, produzindo lesões “*attaching and effacing*” (A/E) (Nataro & Kaper, 1998).

As EAEC causam uma diarreia líquida aguda, acompanhada por febre baixa, sendo que alguns pacientes desenvolvem diarreia prolongada que pode durar até 14 dias (Kuhnert *et al.*, 2000). As EAEC possuem como importantes fatores de virulência as fimbrias de aderência agregativa. A síndrome clínica associada a estes organismos consiste em uma diarreia líquida persistente e mucóide, associada à febre baixa.

As linhagens de *E. coli* pertencentes à categoria ExPEC são as principais causadoras de diversas doenças não relacionadas ao trato intestinal, tais como: infecções do trato urinário, meningite neonatal e infecções intra-abdominais, entre outras (Johnson & Russo, 2002). As linhagens desta categoria são predominantemente dos grupos filogenéticos B2 e D, enquanto que as linhagens comensais pertencem, em sua maioria, aos grupos A e B1. (Johnson & Russo, 2002). As ExPEC possuem uma grande variedade de fatores de virulência, incluindo adesinas, toxinas, proteases e cápsulas, envolvidos na colonização da superfície mucosa do hospedeiro, invasão e lesão dos tecidos (Johnson & Russo, 2002).

Embora exista um grande volume de informação sobre o isolamento de *E. coli* patogênicas ao homem e animais, sua ocorrência no meio ambiente é pouco estudada. Entretanto, a importância da contaminação da água e alimentos (carne bovina, batata, leite de vaca não pasteurizado e hortaliças, entre outros), na veiculação desse patógeno tem sido registrada por vários autores (Mason & Richardson, 1981; Swerdlow *et al.*, 1992; Cieslak *et al.*, 1993; Tarr, 1995; *U. S. Department of Health and Human Services*, 1995; Besser *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1997; Freedman *et al.*, 1998; Shere *et al.*, 1998).

3. *Escherichia coli* e água

O epitélio intestinal dos animais homeotermos é o habitat primário da *E. coli*, o que faz com que seja abundante em fezes de origem humana e animal, onde está presente em concentrações de 10^9 células por grama de fezes frescas. Esta bactéria é encontrada em esgotos, efluentes tratados, em águas, sedimento e solo sujeitos a contaminação fecal recente de origem humana, ou de outros mamíferos e aves (Sevageau, 1983; *World Health Organization*, 1996).

E. coli é considerada o principal indicador da qualidade da água e de contaminação fecal (Edberg *et al.*, 2000). A presença dessa bactéria em água indica perigo de contaminação potencial, uma vez que uma série de patógenos pode ser veiculada através das fezes e requer ação imediata no que diz respeito ao controle de qualidade das águas nos seus mais diversos usos: consumo humano, recreação, irrigação, aquacultura, e outros (Orskov, 1981; Swerdlow *et al.*, 1992; *World Health Organization*, 1996).

Os habitats secundários, como a água, solo e sedimentos, diferem dos habitats primários em vários aspectos como, por exemplo, a oferta de nutrientes (maior no habitat primário), modo de respiração (aeróbica no habitat secundário e anaeróbica no primário), temperatura, constante no habitat primário, ao redor de 37°C, e variável no secundário (Savageau, 1983).

Quanto à disponibilidade de aminoácidos nos dois habitats (primário e secundário), foi observado que existem diferenças. Isto é, na água, no solo e em sedimentos, a concentração de serina e glicina são relativamente altas; alanina, aspartato e treonina aparecem em menor quantidade e os demais aminoácidos estão presentes em pequenas quantidades (Kemp & Mudrochova, 1973; Wetzel, 1975; Savageau, 1983). No habitat primário, os aminoácidos mais abundantes, independentemente da dieta alimentar, são lisina, glutamina, arginina, tirosina e triptofano (Nixon & Mawer, 1970; Savageau, 1977). Ohno *et al.* (1997) estudaram o tempo de sobrevivência da *E. coli* em águas de rios. Estes autores observaram que a *E. coli* sobrevive por mais tempo em água onde a concentração de aminoácidos era significativamente maior. A disponibilidade de açúcares também difere nos dois habitats. Por exemplo, a arabinose é encontrada em altas concentrações no cólon, enquanto que na água, sedimentos e solo, este açúcar está presente em pequenas quantidades (Savageau, 1983).

Embora existam vários trabalhos sobre a sobrevivência e persistência de *E. coli* em ambientes aquáticos, pouco se sabe sobre a adaptação da bactéria a estas condições ao nível de expressão gênica (Espinosa-Urgel & Kolter, 1998). Espinosa-Urgel & Kolter (1998) observaram que a expressão de vários genes de *E. coli* aumentava quando a bactéria era submetida a condições que simulavam ambientes aquáticos. Entre estes genes, estavam alguns operons de RNAt específicos e o gene *gapC*, cuja função ainda não é muito conhecida.

Vários investigadores mostraram que as atividades microbianas são mais intensas em temperatura igual ou superior a 15°C. *E. coli* sobrevive na água de consumo, em média, 4 a 12 semanas, a uma temperatura de 15-18°C (Edberg *et al.*, 2000). Fransolet *et al.* (1985) observaram que o crescimento da *E. coli* e da *Enterobacter aerogenes* é mais lento em temperaturas inferiores a 20°C. LeChevallier *et al.* (1996) mostraram, em um estudo feito entre 1992 e 1993 nos Estados Unidos, que a presença de coliformes na água era maior entre junho e outubro, quando a temperatura é geralmente superior a 15°C. Já Wang & Doyle (1998) observaram que a *E. coli* O157:H7, da categoria EHEC, sobrevive por mais tempo na água na temperatura de 8°C do que a 25°C.

O número de bactéria na água pode aumentar devido a diversos fatores ambientais, como por exemplo, temperatura e o regime de chuvas, que carrega a bactéria de fezes depositadas nas margens ou em bancos de areia de represas e rios (Solo-Gabriele *et al.*, 2000). Badge & Rangari (1999) observaram a existência de variação sazonal de coliformes fecais no lago Upvan na Índia. A contagem de coliformes na água deste lago foi maior na época de chuva.

Diversos casos de contaminação por *E. coli* em águas são relatados ao redor do mundo (Warrner *et al.*, 1996; Ackman *et al.*, 1997; Paunio *et al.*, 1999; Yarze & Chase, 2000; Licence *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2001; Agard *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 2002; Samadpour *et al.*, 2002), em países como Escócia, Estados Unidos e Trinidad e Tobago. Um destes casos ocorreu no estado americano do Missouri, onde 243 habitantes apresentaram diarreia entre dezembro de 1989 e janeiro de 1990. A contaminação ocorreu através do consumo de água municipal, a qual não estava tratada de maneira apropriada (Swerdlow *et al.*, 1992).

Em outro estudo, Feldman *et al.* (2002) concluíram que infecções por *E. coli* O157:NM, na Califórnia, no mês de agosto de 1999, estavam associadas à ingestão de água de um lago usado para recreação. Segundo estes autores, crianças que tomaram uma quantidade maior da água do lago apresentaram uma taxa maior de infecção do que aquelas que tomaram menos ou não ingeriram a água. No Japão, uma criança de 2 anos de idade apresentou diarreia e posteriormente diarreia com sangue após consumir água de um poço com água não clorada. Análises com isolados de *E. coli* das fezes da paciente mostraram se tratar de uma linhagem VTEC O121 Stx-2 positiva (Yatsuyanagi *et al.*, 2002).

Ohno *et al.* (1997) estudaram bactérias enteropatogênicas no rio La Paz, na Bolívia, e observaram um aumento na quantidade de bactérias nos locais mais próximos à foz do rio, onde há maior concentração humana. Estes autores também observaram bactérias enteropatogênicas ao longo do rio, das quais 3 isolados eram *Salmonella* do grupo O4, 5 *E. coli* do “virotipo” ETEC, compreendendo os sorogrupos O6, O159 e O15, 2 EPEC, isoladas de locais diferentes, mas do mesmo sorogrupo (O44) e 2 EIEC, isoladas do mesmo local e pertencentes ao sorogrupo O29.

Yarze & Chase (2000) especularam que um período de seca seguido por forte chuva levou ao alagamento de um poço recém cavado, no estado de Nova Iorque, Estados Unidos, o qual teria sido contaminado por esterco de gado levado de um pasto localizado nas proximidades. Posteriormente, a água foi utilizada para a fabricação de gelo e refresco. Duas semanas depois, ocorreu uma epidemia envolvendo aproximadamente 1000 pessoas com diarreia, sendo que duas morreram devido à síndrome hemolítica-urêmica, causada pela linhagem O157, da categoria VTEC. Na Escócia, Licence *et al.* (2001) encontraram evidências de que uma fonte de água não tratada foi contaminada por animais com O157. Esta fonte de água foi responsável pela contaminação de 6 pessoas. As linhagens isoladas de humanos não se distinguiram daquelas isoladas de animais, quando analisadas através da técnica de “*pulsed field gel eletrophoresis*” (PFGE).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a água deve ser examinada com regularidade, já que a poluição é geralmente intermitente e pode não ser detectada caso os exames sejam realizados em uma única ou em um pequeno número de amostras (Chalmers *et al.*, 2000).

4. Tipagem molecular

A discriminação de genomas é essencial em diversos estudos de microbiologia, incluindo taxonomia, relações filogenéticas, genética de populações de microrganismos e epidemiologia microbiana (van Belkum *et al.*, 2001). Assim sendo, as técnicas de tipagem genética são utilizadas para definir características específicas do objeto em estudo, seja ele linhagens de uma espécie, espécies do mesmo gênero ou até mesmo gêneros diferentes.

Entre estas técnicas estão a ribotipagem, seqüenciamento de DNA, PFGE e rep-PCR (BOX-, ERIC- e REP-PCR), entre outras (van Belkum *et al.*, 2001).

Os métodos de REP-, ERIC- e BOX-PCR baseiam-se na amplificação de seqüências repetitivas do genoma. Os elementos repetitivos REP (*Repetitive Extragenic Palindromes*) foram caracterizados inicialmente em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (Stern *et al.*, 1984). O número de cópias desses elementos no cromossomo de *E. coli* e *S. typhimurium* é de aproximadamente 500-1000 cópias, equivalente a aproximadamente 1% do genoma da bactéria (Stern *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1992). Os elementos ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) foram descritos em várias espécies de bactérias (Hulton *et al.*, 1991). O número de cópias desse elemento em *E. coli* é de aproximadamente 30-50 e, em *S. typhimurium*, de 150 (Sharples & Lloyd, 1990; Hulton *et al.*, 1991). Os elementos BOX foram descritos em *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992). Eles são compostos de 3 subunidades (BOX A, BOX B e BOX C), com número variável de repetições (Martin *et al.*, 1992). O papel destes elementos repetitivos no genoma das bactérias ainda não está claro. Foi sugerido que eles teriam importância na determinação da estrutura e topologia do DNA, além de poderem estar envolvidos em regulação (van Belkum *et al.*, 1998).

Os elementos repetitivos têm sido utilizados em análises de variabilidade de diversas espécies de bactérias. Pooler *et al.* (1996) analisaram a variabilidade genética de linhagens de *Xanthomonas fragariae*, isoladas de diversas regiões geográficas, utilizando REP- e ERIC-PCR, entre outras técnicas. Sadowsky *et al.* (1996) utilizaram REP- e BOX-PCR para analisar linhagens de *Streptomyces* relacionadas e em alguns casos, não diferenciadas por outros métodos de classificação. Com a utilização destes métodos, Sadowsky *et al.* (1996) obtiveram padrões distintos de amplificação de DNA para a maioria das linhagens analisadas. Dombek *et al.* (2000) analisaram 125 linhagens de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de diversos animais através de BOX- e REP-PCR observando padrões complexos e distintos de bandas para as linhagens analisadas. Huang *et al.* (1999) realizaram tipagem genotípica de *Riemerella anatipestifer*, uma bactéria Gram-negativa, assim como a *E. coli*, através de REP-PCR, e observaram 19 padrões diferentes de bandas entre as 35 linhagens analisadas. Além destes trabalhos, outros autores vêm utilizando estas técnicas em seus estudos (Vinuesa *et al.*, 1998; Barker *et al.*, 1999; Clarridge III *et al.*,

1999; Alam *et al.*, 1999; Baldy-Chudzik *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2002; Ventura & Zink, 2002).

5. Grupos filogenéticos

Análises filogenéticas mostraram que as linhagens de *E. coli* pertencem a 4 grupos filogenéticos principais : A, B1, B2 e D. Estes grupos filogenéticos foram definidos com base nas árvores filogenéticas geradas através das técnicas de MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) e ribotipagem (Selander *et al.*, 1986; Herzer *et al.*, 1990).

Foi mostrado também que as linhagens virulentas extraintestinais pertencem em sua maioria ao grupo B2 e, em menor proporção ao grupo D (Bingen *et al.*, 1998; Boyd & Hartl, 1998; Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000). Quanto às linhagens comensais, elas geralmente pertencem aos grupos A e B1, que são altamente relacionados (Bingen *et al.*, 1998). As linhagens pertencentes a estes dois grupos geralmente não possuem fatores de virulência extra-intestinal (Bingen *et al.*, 1998). As linhagens patogênicas intestinais pertencem, geralmente, aos grupos A, B1 e D (Pupo *et al.*, 1997).

Bonacorsi *et al.* (2000) construíram bibliotecas subtrativas para duas linhagens de *E. coli* pertencentes a grupos filogenéticos diferentes. Estes autores propuseram que alguns genes e fragmentos de DNA poderiam ser utilizados como marcadores para a determinação do grupo filogenético de linhagens de *E. coli*. Assim sendo, foi proposta a utilização dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 (isolado de biblioteca subtrativa) para rápida identificação do grupo filogenético de linhagens de *E. coli* através de PCR *multiplex* (Clermont *et al.*, 2000).

Alguns autores basearam seus trabalhos nas análises da distribuição dos grupos filogenéticos de linhagens de *E. coli* isoladas do ambiente e de fezes animais e humanas (Goullet & Picard, 1986; Duriez *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001; Mereghetti *et al.*, 2002). Goullet & Picard (1986) observaram que a proporção de linhagens pertencentes ao grupo filogenético B2 é diferente entre linhagens comensais isoladas de fezes humanas (9%) e de fezes animais (1,6%). Hoffmann *et al.* (2001), analisando a distribuição do gene *chuA* (presente apenas nas linhagens dos grupos B2 e D), codificador da proteína ChuA, em linhagens de *E. coli* isoladas do meio ambiente e humanos, observaram que a frequência

deste gene entre as linhagens isoladas de amostras de água (rios e águas superficiais), na Alemanha, é de 30%. Duriez *et al.* (2001) analisaram a distribuição de 168 linhagens comensais de *E. coli*, isoladas de fezes humanas em três países diferentes (França, Mali e Croácia), entre os quatro grupos filogenéticos. Estes autores encontraram diferenças significativas entre estes países no que se refere à distribuição das linhagens entre os grupos filogenéticos.

A análise dos grupos filogenéticos de linhagens de *E. coli* permite, de maneira rápida, avaliar a organização populacional destas linhagens em diferentes ambientes ou localidades geográficas, além de fornecer indícios da presença ou não de linhagens patogênicas intestinais e da categoria ExPEC, causadoras de doenças extraintestinais, já que estas linhagens pertencem em sua maioria ao grupo B2 (Duriez *et al.*, 2001).

6. Fatores de patogenicidade em *E. coli*

A utilização de técnicas moleculares que possibilitem a determinação dos principais genes de virulência é de grande importância para a caracterização de linhagens de *E. coli* isoladas clinicamente, de alimentos, do solo ou da água. Este tipo de informação ajuda na determinação do potencial patogênico de linhagens, além de auxiliar na descoberta de novos clones patogênicos emergentes que poderão vir a causar sérios riscos na saúde de homens e animais (Kuhnert *et al.*, 2000).

Diversos trabalhos realizados no Brasil já vêm utilizando PCR e hibridação de colônias para detectar os genes de virulência em amostras clínicas de *E. coli* (Monteiro-Neto *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1999; Gioppo *et al.*, 2000).

A hibridação de colônias é uma técnica na qual colônias de bactérias são transferidas, de uma placa de meio sólido para um papel de filtro, lisadas e o DNA é hibridado com sondas marcadas, específicas e complementares a regiões específicas do genoma bacteriano (Mass, 1983). As sondas são desnaturadas e hibridadas ao DNA da bactéria, o qual também foi previamente desnaturado. Valle *et al.* (1997) utilizaram, além de outras técnicas, hibridação de colônias para detectar genes de virulência em 76 linhagens de *E. coli* do sorogrupo O125, isoladas de crianças com diarreia em São Paulo, entre 1977 e 1993. Sete

das linhagens analisadas apresentaram o gene *eae*, que codifica a intimina e 64 apresentaram genes que caracterizam EAEC (*E. coli* enteroagregativa).

Em outro trabalho, Gonçalves *et al.* (1997), também utilizando hibridação de colônias, estudou 110 linhagens do sorogrupo O119, isoladas de diversos países, como Brasil, Chile, Dinamarca e Estados Unidos. Estes autores observaram que no período de 1960-1980, 63% das linhagens estudadas apresentavam os genes *eae*, *bfpA* e o plasmídeo EAF; 12% os genes *eae* e *bfpA* e 25% apenas o gene *eae*. Já no período de 1981-1993, 83% das linhagens possuíam os genes *eae*, *bfpA* e o plasmídeo EAF; 13,5% os genes *eae* e *bfpA* e apenas 1% o gene *eae* isoladamente.

Rogerie *et al.* (2001) utilizaram hibridação de colônias para verificar quais fatores de virulência estavam presentes em colônias da categoria STEC. Estes autores observaram que 60% das colônias possuíam apenas o gene *stx2* e 17% apenas o gene *stx1*.

A técnica de hibridação de colônias possui a vantagem de ser rápida e poder analisar um grande número de linhagens. O uso desta técnica em linhagens de *E. coli* isoladas de água, permite que se tenha conhecimento do perigo potencial da utilização destas águas para a saúde humana.

Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil onde linhagens de *E. coli* isoladas de diversos tipos de água (represas, rios e nascente, mineral, poço e tratada) são avaliadas quanto à variabilidade genética, grupos filogenético aos quais pertencem e potencial patogênico.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O projeto tem por objetivo a análise da variabilidade genética, determinação dos fatores de patogenicidade e grupos filogenéticos de linhagens de *E. coli* isoladas de águas destinadas ao consumo humano e superficiais (represa Billings, represa Guarapiranga, rio Jaguari e rio Sorocaba) no Estado de São Paulo.

Objetivos específicos

CAPÍTULO 1. Determinação da variabilidade genética e fatores de patogenicidade de linhagens de *Escherichia coli* isoladas nas represas Billings e Guarapiranga

Análise da variabilidade genética, através de BOX-, ERIC- e REP-PCR, de linhagens de *Escherichia coli* isoladas pela CETESB.

Determinação do grupo filogenético das linhagens através de amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2.

Avaliação da presença de fatores de patogenicidade intestinais nas linhagens analisadas através de hibridação de colônias.

CAPÍTULO 2. Análise dos grupos filogenéticos de linhagens de *Escherichia coli* isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba

Determinação do grupo filogenético das linhagens através de amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2.

CAPÍTULO 3. Análise da variabilidade genética, presença de fatores de patogenicidade e grupos filogenéticos em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de águas destinadas ao consumo humano no Estado de São Paulo

Análise da variabilidade genética, através de BOX-, ERIC- e REP-PCR, de linhagens de *Escherichia coli* isoladas pela CETESB.

Avaliação da ocorrência de fatores de patogenicidade intestinais nas linhagens analisadas através de hibridação de colônias.

Determinação do grupo filogenético das linhagens analisadas através de amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2.

Capítulo 1

DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E FATORES DE PATOGENICIDADE DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS NAS REPRESAS BILLINGS E GUARAPIRANGA

Introdução

O avanço da urbanização vem comprometendo muito rapidamente a qualidade da água de rios, represas e lagos. A disponibilidade de água doce no meio ambiente é limitada e devemos, portanto, priorizar a preservação, o controle e a utilização racional destas águas.

A partir de dezembro de 1991, 22 UGRHI (Unidades de Gerenciamento dos Recursos Hídricos) foram criadas no Estado de São Paulo, pela Lei Estadual N° 7.663, como parte do Sistema Integrado de Gerenciamento dos Recursos Hídricos. As represas Billings e Guarapiranga fazem parte da UGRHI 06. Estas represas são responsáveis pelo abastecimento de grande parte da zona metropolitana de São Paulo e indústrias da região.

A represa Guarapiranga drena uma área de 631 km² e recebe, diariamente, efluentes domésticos de 5 municípios além de efluentes industriais líquidos. A represa Billings possui uma área de drenagem de 560 km² e também recebe efluentes industriais e domésticos. A qualidade da água nestas represas é constantemente monitorada pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) em amostragens padronizadas. Como são utilizadas para recreação e abastecimento público, a contaminação destas represas por microrganismos pode representar risco para a saúde pública.

A presença de *E. coli* em águas recreacionais é muito preocupante, já que algumas linhagens podem ser patogênicas (Saylers *et al.*, 1994; Gilligan, 1999) ou estar vinculadas a outros microrganismos patogênicos (Orskov, 1981; Swerdlow *et al.*, 1992; *World Health Organization*, 1996). Diversos casos de contaminação por *E. coli* em águas recreacionais já foram descritos (Warnner *et al.*, 1996; Ackman *et al.*, 1997; Paunio *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 2002; Samadpour *et al.*, 2002) em outros países. A Organização Mundial da Saúde sugere que a água deve ser examinada constantemente já que a poluição pode ser episódica e não ser detectada caso os exames sejam realizados em poucas amostras (Chalmers *et al.*, 2000).

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de rep-PCR (BOX-, ERIC e REP-PCR) (Versalovic *et al.*, 1991; Sadowsky *et al.*, 1996) para determinar a variabilidade genética das linhagens de *E. coli* isoladas nas represas Billings e Guarapiranga. Estas técnicas, junto com a determinação dos grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2000) foram utilizadas, também, no estudo das diferenças entre as linhagens isoladas nas duas represas.

Finalmente, experimentos de hibridação de colônias foram realizados para detectar a existência de fatores de virulência intestinais nas linhagens e, assim, determinar o potencial patogênico das mesmas.

Material e métodos

1. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas nos experimentos, 133 linhagens de *E. coli* isoladas pelo Setor de Microbiologia e Parasitologia da CETESB a partir de amostras de água das represas Billings (65 linhagens) e Guarapiranga (68 linhagens), dentro do programa de balneabilidade da CETESB. As linhagens foram isoladas a partir da técnica de membrana filtrante empregando ágar M-Endo e caldo EC (APHA, 1998). As *E. coli* foram analisadas através dos caldos EC positivos, plaqueados em ágar eosina azul de metileno (EAM) e as colônias típicas foram triadas no meio de IAL (Instituto Adolfo Lutz), ágar citrato de Simmon's, caldo lactosado, reação de oxidase e coloração de Gram.

As linhagens isoladas, os locais de coleta e as datas, estão indicadas nas Tabelas 1 (represa Billings) e Tabela 2 (represa Guarapiranga). A presença de chuva nas 24 h que antecederam as coletas nas represas também está indicada nas Tabelas 1 e 2. Os locais de coleta nas represas são mostrados nas Figuras 1 e 2. A linhagem de coleção *Escherichia coli* ATCC 25922 foi incluída nas análises.

2. Armazenamento e obtenção de massa celular das linhagens

As linhagens de *E. coli* isoladas pela CETESB foram inoculadas em 1 mL de meio LB líquido (Sambrook *et al.*, 1989). Aproximadamente 10 µL das culturas obtidas foram plaqueadas separadamente em meio LB sólido (Sambrook *et al.*, 1989). Uma colônia isolada foi escolhida em cada uma das placas e inoculada em 2 mL de meio LB líquido para a preparação de cultura permanente com 25% de glicerol (Sambrook *et al.*, 1989). As culturas permanentes foram armazenadas a -70°C.

Tabela 1: Linhagens isoladas pela CETESB na represa Billings.

Linhagens	Data coleta	Local coleta	Chuva 24 h antes da amostragem
3735	14/09/99	Prainha em frente ETE	-
3736	14/09/99	Clube Prainha Taiti	-
3841	21/09/99	Prainha em frente ETE	-
3842	21/09/99	Clube Prainha Taiti	-
3843	21/09/99	Prainha do Parque Municipal	-
3844	21/09/99	Próx. Zoo do Parque Municipal	-
4219	20/10/99	Prainha em frente ETE	+
4220	20/10/99	Clube Prainha Taiti	+
4221	20/10/99	Prainha do Parque Municipal	+
15	04/01/00	Prainha em frente ETE	+
16	04/01/00	Clube Prainha Taiti	+
17	04/01/00	Prainha do Parque Municipal	+
18	04/01/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	+
20	04/01/00	Praia Jd. Los Angeles	+
94	11/01/00	Prainha em frente ETE	+
96	11/01/00	Prainha do Parque Municipal	+
100	11/01/00	Próx. à entrada DERSA	+
346	26/01/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	+
686	14/02/00	Prainha em frente ETE	+
690	14/02/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	+
691	14/02/00	Praia Jd. Los Angeles	+
876	21/02/00	Prainha em frente ETE	-
878	21/02/00	Prainha do Parque Municipal	-
879	21/02/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	-
880	21/02/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
881	21/02/00	Praia Jd. Los Angeles	-
1042	28/02/00	Prainha do Parque Municipal	-
1043	28/02/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	-

Continuação Tabela 1

1044	28/02/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
1045	28/02/00	Praia Jd. Los Angeles	-
1046	28/02/00	Próx. à entrada DERSA	-
2146	17/04/00	Prainha em frente ETE	-
2147	17/04/00	Clube Prainha Taiti	-
2148	17/04/00	Prainha do Parque Municipal	-
2150	17/04/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
2151	17/04/00	Praia Jd. Los Angeles	-
2282	24/04/00	Prainha em frente ETE	-
2283	24/04/00	Clube Prainha Taiti	-
2284	24/04/00	Prainha do Parque Municipal	-
2285	24/04/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	-
2286	24/04/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
2288	24/04/00	Próx. à entrada DERSA	-
3123	13/06/00	Prainha em frente ETE	-
3124	13/06/00	Clube Prainha Taiti	-
3126	13/06/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	-
3128	13/06/00	Praia Jd. Los Angeles	-
3129	13/06/00	Próx. à entrada DERSA	-
3130	13/06/00	Parque Imigrantes	-
5060	07/11/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	-
5061	07/11/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
5062	07/11/00	Praia Jd. Los Angeles	-
5063	07/11/00	Próx. à entrada DERSA	-
5670	19/12/00	Prainha em frente ETE	+
5671	19/12/00	Clube Prainha Taiti	+
5672	19/12/00	Prainha do Parque Municipal	+
5673	19/12/00	Próx. Zoo do Parque Municipal	+
5674	19/12/00	Clube Campo Sind. Met. ABC	+
5675	19/12/00	Praia Jd. Los Angeles	+
5676	19/12/00	Próx. à entrada DERSA	+

Continuação Tabela 1

1569	09/04/01	Clube Prainha Taiti	-
1570	09/04/01	Prainha do Parque Municipal	-
1572	09/04/01	Clube Campo Sind. Met. ABC	-
1573	09/04/01	Praia Jd. Los Angeles	-
1574	09/04/01	Próx. à entrada DERSA	-
1575	09/04/01	Parque Imigrantes	-

Tabela 2: Linhagens isoladas pela CETESB na represa Guarapiranga.

Linhagens	Data coleta	Local coleta	Chuva 24 h antes da amostragem
3742	14/09/99	Parque Guarapiranga	-
3743	14/09/99	Restaurante do Odair	-
3744	14/09/99	Marina Guaraci	-
4100	05/10/99	Marina Jd. 3 Marias	+
4101	05/10/99	Marina Guarapiranga	+
4102	05/10/99	Restaurante Interlagos	+
4103	05/10/99	Club de Campo Castelo	+
4552	09/11/99	Restaurante Interlagos	+
4547	09/11/99	Assoc. Func. Públicos Est. SP	+
4556	09/11/99	Bairro Miami Paulista	+
4678	18/11/99	Bairro Miami Paulista	-
4671	18/11/99	Yacht Club Santo Amaro	-
4667	18/11/99	Assoc. Func. Públicos Est. SP	-
108	11/01/00	Marina Guarapiranga	+
109	11/01/00	Club de Campo Castelo	+
111	11/01/00	Prainha do Jd. Represa	+
681	14/02/00	Club de Campo Castelo	+
855	21/02/00	Parque Guarapiranga	-
858	21/02/00	Assoc. Func. Públicos Est. SP	-
860	21/02/00	Yacht Club Santo Amaro	-

Continuação Tabela 2

864	21/02/00	Clube de Campo Castelo	-
867	21/02/00	Bairro Miami Paulista	-
868	21/02/00	Parque Estadual Guarapiranga	-
1014	28/02/00	Marina Guaraci	-
1017	28/02/00	Yacht Club Santo Amaro	-
1019	28/02/00	Marina Guarapiranga	-
1020	28/02/00	Restaurante Interlagos	-
1021	28/02/00	Club de Campo Castelo	-
1023	28/02/00	Prainha do Jd. Represa	-
1024	28/02/00	Bairro Miami Paulista	-
1025	28/02/00	Parque Estadual Guarapiranga	-
2154	17/04/00	Parque Guarapiranga	-
2155	17/04/00	Próximo Restaurante do Odair	-
2156	17/04/00	Marina Guaraci	-
2158	17/04/00	Prainha do Bairro do Crispim	-
2161	17/04/00	Marina Guarapiranga	-
2163	17/04/00	Club de Campo Castelo	-
2164	17/04/00	Club de Campo São Paulo	-
2165	17/04/00	Prainha do Jd. Represa	-
2166	17/04/00	Bairro Miami Paulista	-
2262	24/04/00	Parque Guarapiranga	-
2263	24/04/00	Próximo Restaurante do Odair	-
2264	24/04/00	Marina Guaraci	-
2265	24/04/00	Assoc. Func. Públicos Est. SP	-
2266	24/04/00	Prainha do Bairro do Crispim	-
2267	24/04/00	Yacht Club Santo Amaro	-
2269	24/04/00	Marina Guarapiranga	-
2272	24/04/00	Club de Campo São Paulo	-
2273	24/04/00	Prainha do Jd. Represa	-
5639	18/12/00	Parque Guarapiranga	+
5640	18/12/00	Marina Guaraci	+

Continuação Tabela 2

5641	18/12/00	Marina Jd. 3 Marias	+
5642	18/12/00	Marina Guarapiranga	+
5643	18/12/00	Restaurante Interlagos	+
5644	18/12/00	Club de Campo Castelo	+
5645	18/12/00	Club de Campo São Paulo	+
5646	18/12/00	Prainha do Jd. Represa	+
5647	18/12/00	Bairro Miami Paulista	+
1538	09/04/01	Próximo Restaurante do Odair	-
1539	09/04/01	Marina Guaraci	-
1540	09/04/01	Assoc. Func. Públicos Est. SP	-
1541	09/04/01	Prainha do Bairro do Crispim	-
1543	09/04/01	Marina Jd. 3 Marias	-
1544	09/04/01	Marina Guarapiranga	-
1545	09/04/01	Restaurante Interlagos	-
1547	09/04/01	Club de Campo São Paulo	-
1548	09/04/01	Prainha do Jd. Represa	-
1549	09/04/01	Bairro Miami Paulista	-

3. Isolamento de DNA

Para o isolamento do DNA genômico das linhagens foi utilizado o kit *GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. A concentração do DNA das diferentes amostras foi determinada através de comparação com concentrações conhecidas de DNA de fago λ em gel de 0,8% de agarose, em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989).



Figura 1: Pontos de coleta das linhagens de *Escherichia coli* na represa Billings. Fonte CETESB; www.cetesb.sp.gov.br.

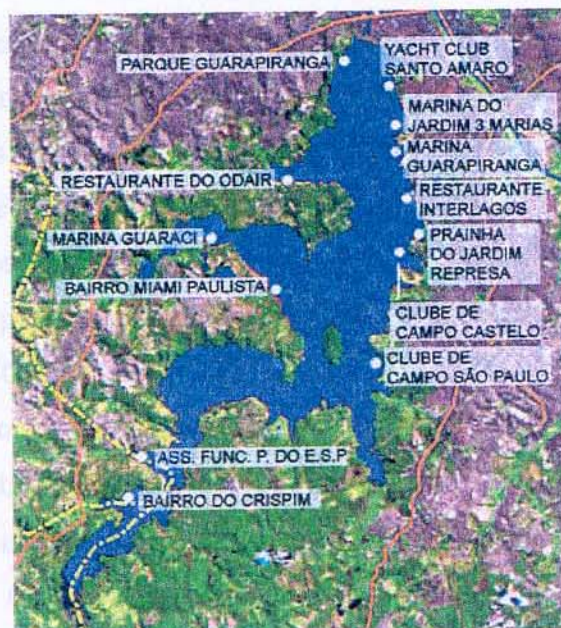


Figura 2: Pontos de coleta das linhagens de *Escherichia coli* na represa Guarapiranga. Fonte CETESB; www.cetesb.sp.gov.br.

4. Análises de rep-PCR

BOX - A análise do genoma das bactérias através de BOX-PCR foi feita segundo modificações na metodologia descrita por Sadowsky *et al.* (1996). Para isto, foram realizadas reações de amplificação em um volume final de 25 µL contendo: 10 ng de DNA, 50 pmoles do *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAGG-3'), tampão da *Taq* polimerase 1X concentrado, 0,1 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂ e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). Todas as reações foram feitas em duplicata. As condições de amplificação foram: denaturação inicial a 95°C por 7 min, seguida por 30 ciclos de amplificação (94°C – 1 min, 53°C – 1 min, 56°C – 4 min) e extensão final a 65°C por 16 min.

ERIC - A análise através de ERIC-PCR foi feita segundo modificações na metodologia descrita por Versalovic *et al.* (1991). Os *primers* utilizados foram: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 50 ng de DNA, 25 pmoles de cada *primer*, tampão da *Taq* polimerase 1X concentrado, 0,1 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). Todas as reações foram realizadas em duplicata. As condições de amplificação foram: denaturação inicial a 95°C por 7 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C – 1 min, 52°C – 1 min, 65°C – 8 min) e extensão final a 65°C por 16 min.

REP - A análise pela técnica de REP-PCR deu-se através da utilização dos *primers*: REP1R-1 (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') tomando como base a metodologia descrita por Versalovic *et al.* (1991). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 50 ng de DNA, 75 pmoles de cada *primer*, tampão da *Taq* polimerase 1X concentrado, 0,1 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As condições de amplificação foram: denaturação inicial a 95°C por 6 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C – 1 min, 40°C – 1 min, 65°C – 4 min) e extensão final a 65°C por 16 min.

Os produtos de amplificação (BOX-, ERIC- e REP-PCR) foram visualizados através de eletroforese em gel de 1,5% de agarose em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de peso molecular foi utilizado, no gel, o *Ladder* 1 Kb (Gibco BRL). Após a eletroforese, o gel foi corado por 20 min com brometo de etídio (0,5 µg/mL), descorado por 1 h em água destilada e fotografado sob luz U.V.

5. Análise de padrões de rep-PCR

Os padrões de bandas das linhagens, obtidos através de BOX-, ERIC- e REP-PCR, foram analisados utilizando o programa GelCompar v. 4,1 (*Applied Maths*, Kortrijk, Bélgica). O programa identifica os padrões de bandas das diferentes linhagens e constrói dendrograma baseado na intensidade e presença e ausência de bandas. Nas análises foram utilizados o coeficiente de Pearson (1926) e o método de agrupamento UPGMA (Sokal & Michener, 1958). Os dados combinados de BOX-, ERIC- e REP-PCR foram utilizados na construção de dendrogramas e análises estatísticas.

6. Determinação dos grupos filogenéticos das linhagens

A determinação do grupo filogenético das linhagens foi realizada de acordo com Clermont *et al.* (2000). Para tal, foram utilizados os *primers* ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3') e ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'), para amplificar um fragmento do gene *chuA*, YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG-3') e YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'), para amplificar um fragmento do gene *yjaA*, e TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTCGGGGCATTCA-3') e TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), para amplificar o fragmento TSPE4.C2. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo: 200 ng de DNA, 4 pmoles de cada *primer*, tampão da *Taq* polimerase 1X concentrado, 2 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 30 s) e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de amplificação

foram visualizados através de eletroforese em gel de 2,0% de agarose, contendo brometo de etídio, em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de peso molecular foi utilizado, no gel, o *Ladder* 100 bp (Gibco BRL). Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz U.V. e analisado. Um esquema da análise é apresentado na Figura 3.

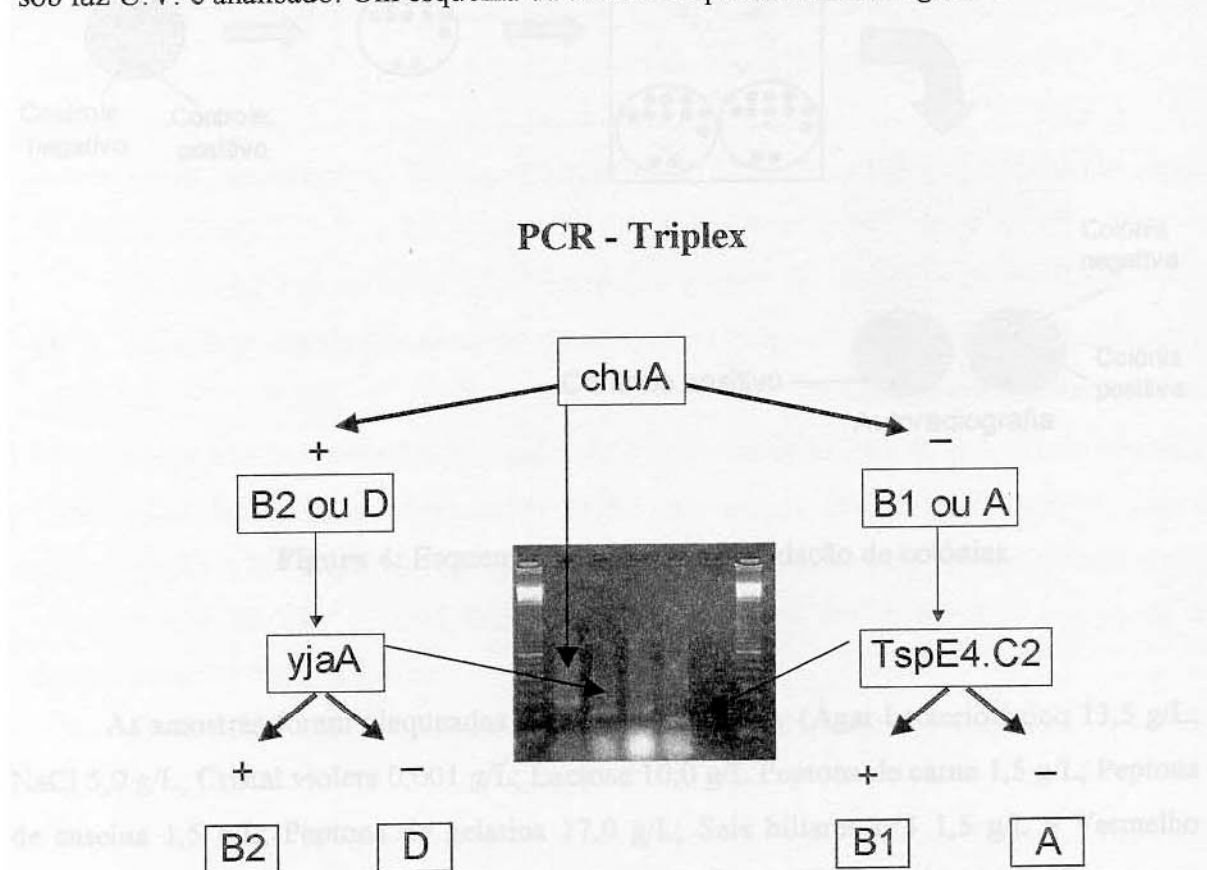


Figura 3: Análise da determinação dos grupos filogenéticos. Adaptado de Clermont *et al.* (2000).

7. Determinação de fatores de patogenicidade por hibridação de colônia

Para análise do potencial patogênico das linhagens foi utilizado o método de hibridação de colônias (Maas, 1983), esquematizado na Figura 4.

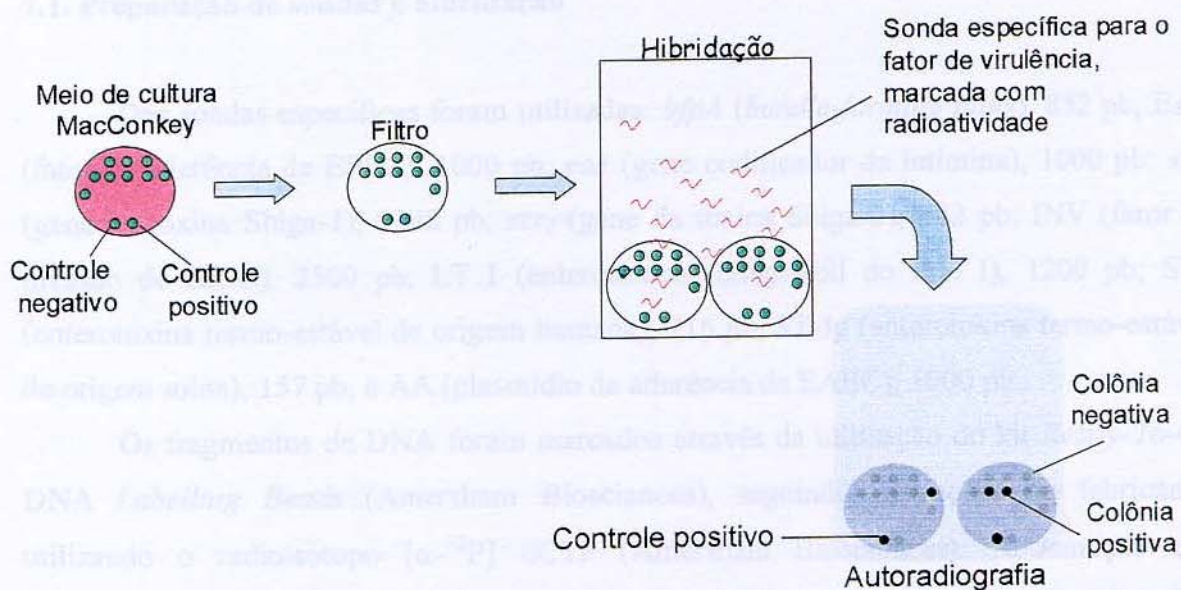


Figura 4: Esquema da técnica de hibridação de colônias.

As amostras foram plaqueadas em ágar MacConkey (Ágar bacteriológico 13,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; Cristal violeta 0,001 g/L; Lactose 10,0 g/L; Peptona de carne 1,5 g/L; Peptona de caseína 1,5 g/L; Peptona de gelatina 17,0 g/L; Sais biliares nº3 1,5 g/L e Vermelho neutro 0,03 g/L pH 7,1) e incubadas durante a noite a 37°C. Após o crescimento, as colônias foram transferidas para papel de filtro Whatman 541. Em seguida, as placas, contendo os papéis de filtro, foram incubadas por 1 h em estufa a 37°C. Após este período, o papel de filtro foi retirado da placa e colocado sobre papel de filtro normal, embebido em solução desnaturante (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) dentro de um pirex, exposto a vapores de água durante 3 min.

Posteriormente, os filtros foram transferidos para um pirex contendo a mesma solução desnaturante, porém sem vapores de água, onde permaneceram por 1 min. Em seguida, os filtros foram transferidos para outro pirex contendo a solução neutralizante (Tris 1 M, pH 7,0 e NaCl 2 M) por 4 min. A seguir, os filtros foram secos e guardados.

7.1. Preparação de sondas e hibridação

Dez sondas específicas foram utilizadas: *bfpA* (*bundle-forming pilus*), 852 pb; EAF (fator de aderência de EPEC), 1000 pb; *eae* (gene codificador da intimina), 1000 pb; *stx₁* (gene da toxina Shiga-1), 1142 pb; *stx₂* (gene da toxina Shiga-2), 842 pb; INV (fator de invasão de EIEC), 2500 pb; LT I (enterotoxina termo-lábil do tipo I), 1200 pb; STh (enterotoxina termo-estável de origem humana), 216 pb; ST-Ip (enterotoxina termo-estável de origem suína), 157 pb; e AA (plasmídeo de aderência de EAEC), 1000 pb.

Os fragmentos de DNA foram marcados através da utilização do kit *Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (Amersham Biosciences), seguindo instruções do fabricante, utilizando o radioisótopo [α -³²P] dCTP (Amersham Biosciences). A remoção dos nucleotídeos não incorporados foi realizada através da utilização de colunas de Sephadex G-50 (*Nick Spin Columns* Sephadex G-50, Amersham Biosciences), com 4 min de centrifugação a 3000 rpm em microcentrífuga. O volume coletado foi completado para 1 mL com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e a sonda foi desnaturada por 5 min a 100°C.

Os filtros foram incubados em solução de pré-hibridação (Formamida 50%, SSC 5X, SDS 0,1%, Na₂EDTA 1 mM, solução de Denhardt's 1X (Sambrook *et al.*, 1989)) a 37°C por pelo menos 1 h, sob agitação lenta. Após esta etapa, os filtros foram incubados na solução de hibridação (solução de pré-hibridação acrescida de DNA de espermatozoides de salmão previamente desnaturado, na concentração de 100 µg/mL e do DNA da sonda desnaturado (~ 10⁵ cpm/mL) por 18 a 24 horas sob agitação lenta, a 37°C.

Após incubação com a solução de hibridação, os filtros foram lavados por 3X (30 min cada vez) com solução de SSC 2X (SSC 20 X, pH 7,0: NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 M) a 37°C sob agitação lenta e secados a 37°C. Os filtros foram expostos a filme de raio-X (Amersham Biosciences) em cassete contendo tela intensificadora, a -70°C e revelados conforme especificações do fabricante.

8. Análises estatísticas

Os testes de Qui-quadrado foram realizados utilizando o programa Biostat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000). Em alguns casos, quando o valor esperado para linhagens do grupo B2 foi menor do que três, somou-se os números de linhagens deste grupo com os do grupo D, já que o grupo D é o mais próximo evolutivamente do grupo B2.

A frequência de cada grupo filogenético por represa e estação do ano foram organizadas em tabelas de contingência e analisadas através de modelos log-lineares (Everitt, 1977; Fienberg, 1978), utilizando o programa Estatística.

O cálculo dos intervalos de confiança das médias das similaridades nas duas represas foi realizado por meio de 4000 Bootstraps, através do programa *Resampling Stats* 2.0 (*Resampling Stats Inc.*, <http://www.resample.com/>), versão para Excell (*Microsoft Corporation*). Para testar se havia maior similaridade entre linhagens isoladas da mesma represa do que entre represas diferentes, foi realizado um procedimento de aleatorização (Manly, 1998; Simon, 1997), utilizando o programa *Resampling Stats* 2.0.

Em todos os testes foi utilizado o valor de significância de 5%.

Resultados e Discussão

1. Análise da variabilidade genética das linhagens através de BOX-, ERIC- e REP-PCR

Um total de 65 linhagens de *E. coli* isoladas da represa Billings e 68 da represa Guarapiranga tiveram o DNA isolado, quantificado e utilizado em amplificações com os *primers* de BOX-, ERIC- e REP-PCR. Padrões complexos e distintos de bandas foram obtidos para todas as linhagens analisadas. O tamanho das bandas amplificadas com o *primer* de BOX variou de aproximadamente 298 pb a 4000 pb. O tamanho das bandas obtidas com os *primers* de ERIC variou de aproximadamente 220 pb a 5000 pb. As bandas obtidas com os *primers* de REP também variaram de 220 pb a 5000 pb. Dombek *et al.* (2000) observaram fragmentos variando entre 300 pb a 4500 pb quando utilizou as técnicas de REP e BOX-PCR em linhagens de *E. coli* isoladas de diversos animais. O alto grau de polimorfismo observado entre as linhagens nas amplificações com os *primers* de BOX, ERIC e REP demonstrou a eficácia destes métodos na diferenciação de linhagens de *E. coli*.

Os dados obtidos através de BOX-, ERIC- e REP-PCR foram utilizados em uma análise combinada. Este tipo de procedimento é interessante, pois reúne os dados obtidos através de diferentes técnicas, tornando a análise mais completa. Diferentes autores vêm utilizando este tipo de procedimento para analisar linhagens de bactérias (Versalovic *et al.*, 1991; Vinuesa *et al.*, 1998; Selenska-Pobell *et al.*, 1998; Paulino *et al.*, 2001). Como pode ser observado no dendrograma da Figura 5, a análise combinada mostrou a existência de uma grande variabilidade genética entre as linhagens isoladas da represa Billings. Duas linhagens (3129 e 5675) agrupadas com 64,1% de similaridade apresentaram a menor similaridade em relação às outras linhagens (30,0%). Isoladamente, as linhagens mais diferentes foram a 1043 e a ATCC, que apresentaram 46,2% e 40,2% de similaridade com as outras linhagens analisadas, respectivamente. As linhagens que apresentaram maiores similaridades foram: 18 e 94 que ficaram agrupadas com 88,9% de similaridade, 3130 e 5060 com 83,6% de similaridade, 2285 e 5676 agrupadas com 82,6% de similaridade, e 2148 e 3126 com 81,9% de similaridade. Algumas linhagens isoladas no mesmo dia foram

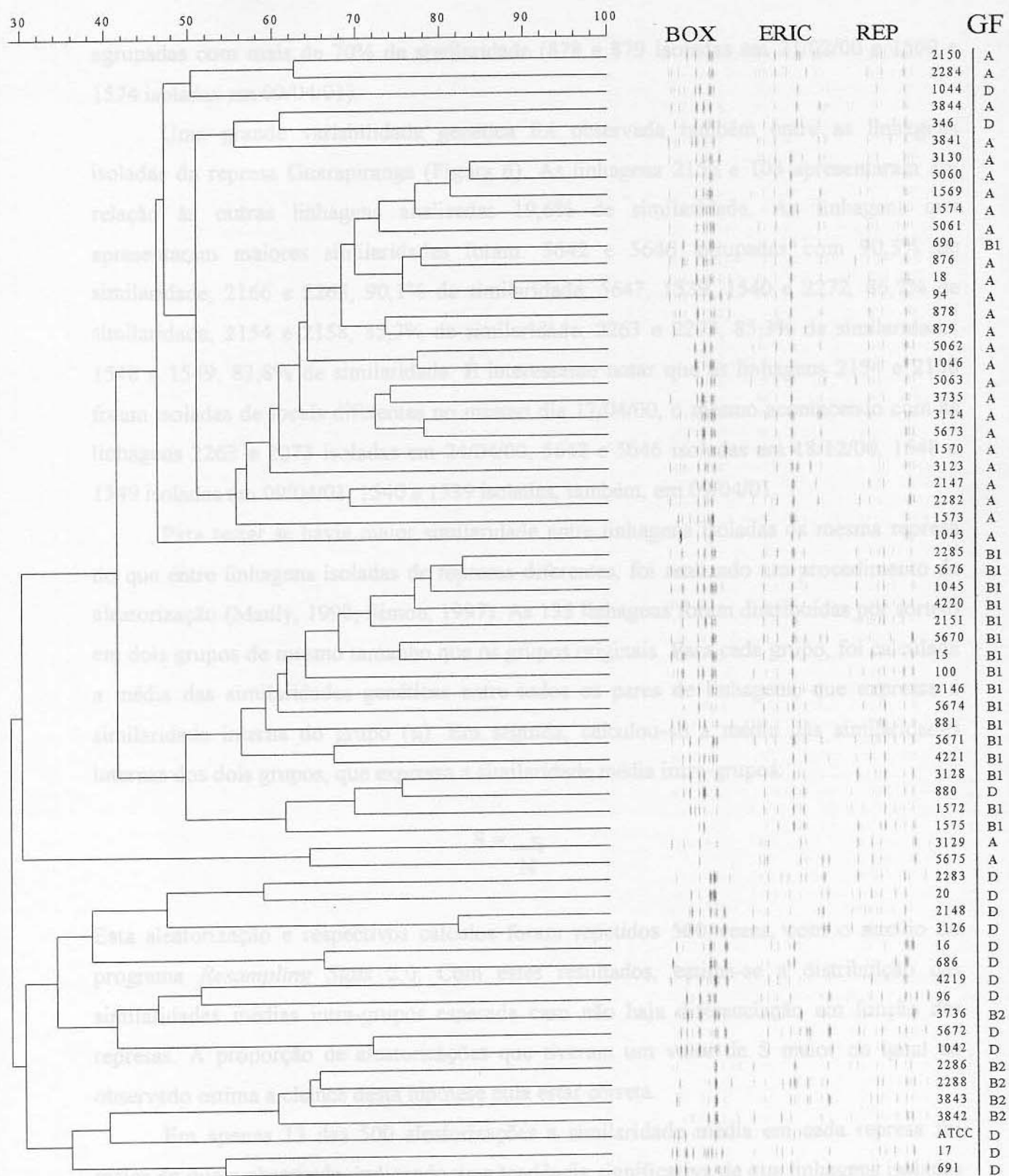


Figura 5: Dendrograma das linhagens isoladas na represa Billings, obtido através da análise combinada dos dados de BOX-, ERIC- e REP-PCR. GF- Grupo filogenético ao qual a linhagem pertence.

agrupadas com mais de 70% de similaridade (878 e 879 isoladas em 21/02/00 e 1569 e 1574 isoladas em 09/04/01).

Uma grande variabilidade genética foi observada também entre as linhagens isoladas da represa Guarapiranga (Figura 6). As linhagens 2156 e 108 apresentaram em relação às outras linhagens analisadas 19,6% de similaridade. As linhagens que apresentaram maiores similaridades foram: 5642 e 5646 agrupadas com 90,5% de similaridade, 2166 e 2265, 90,1% de similaridade; 5647, 1539, 1540 e 2272, 86,7% de similaridade; 2154 e 2158, 85,3% de similaridade; 2263 e 2273, 85,3% de similaridade; 1548 e 1549, 83,8% de similaridade. É interessante notar que as linhagens 2154 e 2158 foram isoladas de locais diferentes no mesmo dia 17/04/00, o mesmo acontecendo com as linhagens 2263 e 2273 isoladas em 24/04/00, 5642 e 5646 isoladas em 18/12/00, 1548 e 1549 isoladas em 09/04/01, 1540 e 1539 isoladas, também, em 09/04/01.

Para testar se havia maior similaridade entre linhagens isoladas da mesma represa do que entre linhagens isoladas de represas diferentes, foi realizado um procedimento de aleatorização (Manly, 1998; Simon, 1997). As 133 linhagens foram distribuídas por sorteio em dois grupos de mesmo tamanho que os grupos originais. Para cada grupo, foi calculada a média das similaridades genéticas entre todos os pares de linhagens, que expressa a similaridade interna do grupo (s_i). Em seguida, calculou-se a média das similaridades internas dos dois grupos, que expressa a similaridade média intra-grupos:

$$S = \frac{\sum s_i}{N}$$

Esta aleatorização e respectivos cálculos foram repetidos 500 vezes, com o auxílio do programa *Resampling Stats* 2.0. Com estes resultados, estima-se a distribuição das similaridades médias intra-grupos esperada caso não haja diferenciação em função das represas. A proporção de aleatorizações que tiveram um valor de S maior ou igual ao observado estima a chance desta hipótese nula estar correta.

Em apenas 13 das 500 aleatorizações a similaridade média em cada represa foi maior do que a observada, indicando uma tendência significativa de que linhagens isoladas de uma mesma represa sejam mais semelhantes entre si do que quando comparadas com linhagens isoladas da outra represa ($p = 0,026$). A diferença entre as linhagens de *E. coli*

das duas represas sugere que não há eventos de migração, e/ou que há diferentes eventos de contaminação nestas represas.

Para comparar a similaridade entre os conjuntos de linhagens obtidos das diferentes represas, foi usada a média das similaridades em cada um destes conjuntos (s_i). Os intervalos de confiança destas médias foram estimados por "Bootstrap" (Efron & Tibshirani 1993, Dixon 1993), sorteando-se com reposição os valores observados das similaridades entre os pares de linhagens, para compor amostras com o mesmo número de valores que a matriz original de similaridades. Foram construídas 4000 amostras "Bootstrap" e calculadas suas similaridades médias para cada conjunto de linhagens, com o auxílio do programa *Resampling*. Estima-se o intervalo de confiança a 95% como o conjunto delimitado pelos 100 maiores e 100 menores valores obtidos nas 4000 reamostragens (os 5% extremos da distribuição de valores, Dixon 1993). A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

As médias das similaridades foram similares nas duas represas (Tabela 5), e podem ser consideradas estatisticamente iguais ($p > 0,05$), pois seus intervalos de confiança a 95% se sobrepõem (Tabela 5). A sobreposição dos intervalos de confiança sugere que as linhagens das duas represas sofrem o mesmo tipo de seleção e/ou que as linhagens contaminantes da represa Guarapiranga possuíam os mesmos graus de similaridade que as linhagens contaminantes da represa Billings.

Tabela 5: Médias das similaridades e intervalos de confiança.

Represas	Média	IC¹ superior	IC inferior
Billings	39,33992	40,0184	38,67315
Guarapiranga	40,57783	41,31228	39,83061
Total	39,958875		

¹IC: intervalo de confiança;

Pela premissa de que quanto maior a diferença entre duas linhagens, maior o tempo de divergência entre elas, uma abordagem alternativa foi utilizada para estimar a diversidade genética das linhagens isoladas em uma mesma represa. Com base nos

dendrogramas, um gráfico foi construído como uma função cumulativa do número de linhagens relativo ao nível de similaridade (tempo) (Figura 7). A hipótese nula é a de que a distribuição dos tempos de divergência é exponencialmente distribuída, ou seja, o tempo entre eventos sucessivos de divergência diminui progressivamente com o aumento da distância da raiz da árvore (Martin, 2002).

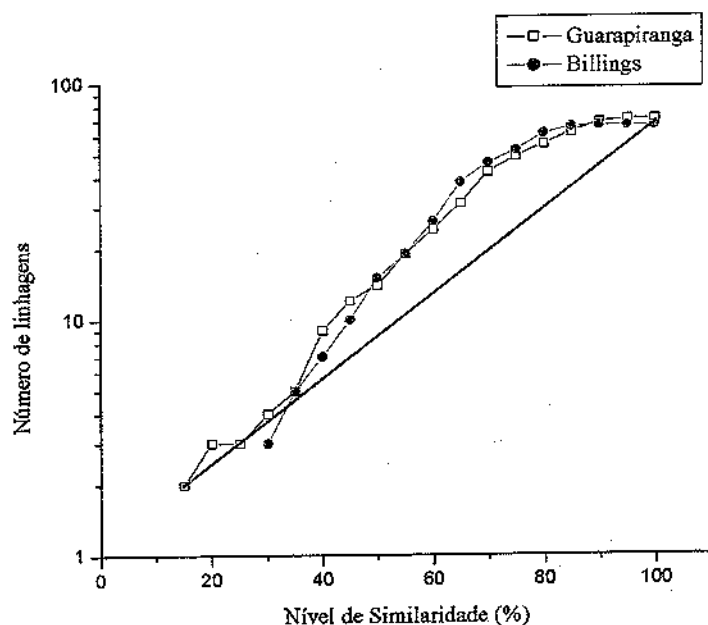


Figura 7: Gráfico construído a partir da contagem do número de linhagens presentes em intervalos do nível de similaridade. O traço vermelho representa a hipótese nula de que taxas de aparecimento e extinção de linhagens são constantes.

O gráfico (Figura 7) apresenta um excesso de linhagens divergentes, nas duas represas, sugerindo diversos eventos de contaminação nestas represas, além de indicar que a seleção pode manter uma alta diversidade neste ambiente.

2. Análise dos grupos filogenéticos

Os grupos filogenéticos das linhagens isoladas das represas Billings (Figura 5) e Guarapiranga (Figura 6) foram determinados através da metodologia descrita por Clermont

et al. (2000). Os agrupamentos obtidos nos dendrogramas com os dados combinados de BOX-, ERIC- e REP-PCR incluíram de uma maneira geral linhagens de um mesmo grupo filogenético (Figura 5 e 6). Rademaker *et al.* (2000) sugerem que as informações geradas por técnicas de tipagem molecular aplicadas a bactérias, como rep-PCR, refletem as informações filogenéticas e taxonômicas das mesmas. Na represa Billings, foram encontradas 28 (43,1%) linhagens do grupo filogenético A, 17 (26,2%) B1, 5 (7,7%) B2 e 15 (23%) D. Na represa Guarapiranga, foram encontradas 44 (64,7%) linhagens do grupo filogenético A, 15 (22,1%) B1, 3 (4,41%) B2 e 6 (8,8%) D.

Modelos log-lineares foram utilizados nas análises das frequências dos grupos filogenéticos por represa e estação do ano. Estes modelos foram criados para o estudo das interações entre variáveis categóricas. Os modelos permitem testar a independência simultânea entre todas as variáveis assim como a independência parcial de um grupo delas mantidas as demais constantes (Everitt, 1977; Fienberg, 1978; Dilon & Goldstein, 1984). Assim, é possível testar não só a independência entre o grupo filogenético, a represa e a estação do ano, como também as independências entre grupo filogenético e represa em cada estação do ano, grupo filogenético e período do ano em cada represa e represa e estação do ano em cada grupo filogenético.

Os modelos log-lineares indicaram uma associação significativa entre grupo filogenético e estação do ano ($\chi^2 = 6,59$; g.l. = 2, $p = 0,037$). As principais diferenças em relação ao esperado na ausência desta associação foram uma maior frequência de linhagens do grupo A no outono e menor frequência de linhagens dos grupos B2 e D nesta estação (Tabela 6). Outra associação significativa foi observada entre grupos filogenéticos e represas ($\chi^2 = 7,82$; g.l. = 2, $p = 0,020$). As principais diferenças em relação ao esperado na ausência desta associação foram diminuição na frequência de linhagens do grupo A na represa Billings e aumento na frequência de linhagens dos grupos B2 e D nesta represa, o inverso ocorrendo na represa Guarapiranga (Tabela 7).

Tabela 6: Desvios padrão¹ do modelo log-linear que testa a correlação entre grupo filogenético e estação do ano.

Estação	Reservatório	Grupos		
		A	B1	B2+D
Outono	Billings	0,479	-0,261	-1,018
	Guarapiranga	1,031	0,046	-1,348
Verão	Billings	-0,385	0,210	0,818
	Guarapiranga	-0,829	-0,037	1,084

¹Desvio padrão = (Observado-Esperado)/(Esperado)²

Tabela 7: Desvios padrão¹ do modelo log-linear que testa a correlação entre grupo filogenético e represas.

Estação	Reservatório	Grupos		
		A	B1	B2+D
Outono	Billings	-0,994	0,055	1,207
	Guarapiranga	0,972	-0,054	-1,180
Verão	Billings	-0,702	0,391	1,120
	Guarapiranga	0,687	-0,382	-1,095

¹Desvio padrão = (Observado-Esperado)/(Esperado)²

Goullet & Picard (1986) observaram que a proporção de linhagens pertencentes ao grupo filogenético B2 é diferente entre linhagens comensais isoladas de fezes humanas (9%) e de fezes animais (1,6%). Duriez *et al.* (2001) estudaram linhagens de *E. coli* isoladas de humanos saudáveis em 3 países (França, Mali e Croácia). Estes autores constataram que a frequência das linhagens do grupo B2 em Mali (2,0%) era muito próxima daquela descrita para animais (1,6%). Na Croácia, a frequência de linhagens deste grupo foi de 19%, enquanto que na França foi de 10,5%. As proporções de linhagens do grupo B2 isoladas nas duas represas são intermediárias aos valores descritos por Goullet & Picard, em 1986 (Billings = 7,69% e Guarapiranga = 4,41%). Estas proporções não são significativamente diferentes das descritas para linhagens isoladas de humanos e nem de

animais (Tabela 8). Entretanto, a proporção observada para as linhagens isoladas na represa Billings parece ser muito mais próxima daquela observada para linhagens isoladas de humanos do que de animais. Por outro lado, na represa Guarapiranga, a situação se inverte, estando a proporção observada para as linhagens desta represa mais próxima à proporção descrita para linhagens isoladas de animais do que de humanos (Tabela 8). Estes resultados sugerem a possibilidade de haver mais contaminação de origem humana do que animal na represa Billings, enquanto que na represa Guarapiranga, a contaminação animal é mais freqüente.

Tabela 8: Comparação das proporções observadas de linhagens pertencentes ao grupo filogenético B2, nas represas Billings e Guarapiranga, com as proporções descritas para isolados comensais de humanos e de animais.

Represas	Proporção de isolados humanos (9%)			Proporção de isolados animais (1,6%)		
	χ^2	G. L.	p	χ^2	G. L.	p
Billings	0,157	1	0,6924	3,398	1	0,0653
Guarapiranga	3,395	1	0,0654	1,272	1	0,2594

Hoffmann *et al.* (2001), analisando a distribuição do gene *chuA* em linhagens de *E. coli* isoladas do meio ambiente e humanos, observaram que a freqüência deste gene entre as linhagens isoladas de amostras de água (rios e águas superficiais), na Alemanha, é de 30%. Em nosso trabalho, um par de *primers* foi utilizado na amplificação de um fragmento do gene *chuA* para determinação dos grupos filogenéticos das linhagens, sendo que este fragmento é restrito aos grupos B2 e D. Comparando os nossos resultados com aquele obtido por Hoffmann *et al.* (2001), verificou-se que as linhagens isoladas na represa Billings apresentam o fragmento *chuA* na mesma proporção (30,7%) descrita pelos autores ($\chi^2 = 0,018$; G. L. = 1; p = 0,8923). O mesmo não acontece com a represa Guarapiranga,

onde a frequência observada do fragmento foi de 13,23% ($\chi^2 = 9,101$; G. L. = 1; $p = 0,0026$).

Hoffmann *et al.* (2001) sugerem que a proteína ChuA está envolvida na colonização do hospedeiro humano. Assim sendo, a maior frequência deste fragmento entre as linhagens isoladas na represa Billings está de acordo com a análise da frequência das linhagens pertencentes ao grupo B2, a qual sugere que nesta represa, a contaminação humana parece ser mais frequente do que a contaminação animal.

3. Fatores de patogenicidade

A análise do potencial patogênico das linhagens isoladas nas represas Billings e Guarapiranga foi realizada através da utilização da técnica de hibridação de colônias. Um exemplo dos resultados obtidos é mostrado na Figura 8. Três linhagens isoladas na represa Billings e 8 isoladas na represa Guarapiranga apresentaram resultado positivo quando hibridadas com uma das sondas (Tabelas 9 e 10). Nenhuma das linhagens apresentou mais do que uma sequência de um fator de virulência.

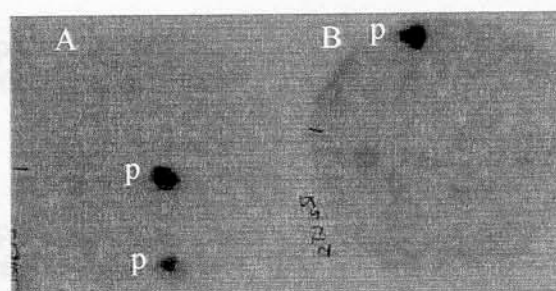


Figura 8: Hibridação de colônias. (p)= colônias que apresentaram resultado positivo para as sondas AA (A) e LT I (B).

Três linhagens isoladas na Billings (94, 878 e 881) apresentaram resultado positivo quando o seu DNA foi hibridado com a sonda AA, referente ao plasmídio de aderência de EAEC. Com relação à represa Guarapiranga, 3 linhagens (868, 109 e 2265) também apre-

Tabela 9: Linhagens isoladas na represa Billings que apresentaram resultado positivo com a sonda AA (plasmídio de aderência agregativa).

Linhagens	Seqüência de virulência	Grupo Filogenético	Data da coleta	Local da coleta
94	plasmídio de aderência agregativa	A	11/01/2000	Prainha em frente à ETE
878	plasmídio de aderência agregativa	A	21/02/2000	Pq. Municipal
881	plasmídio de aderência agregativa	B1	21/02/2000	Jardim Los Angeles

Tabela 10: Linhagens isoladas na represa Guarapiranga que apresentaram resultado positivo com as sondas *eae* (gene codificador da intimina), *stx*₂ (gene da toxina Shiga-2), AA (plasmídio de aderência agregativa) e LT I (enterotoxina termo-lábil do tipo I).

Linhagens	Seqüência de virulência	Grupo Filogenético	Data da coleta	Local da coleta
4102	<i>eae</i>	B2	05/10/1999	Restaurante Interlagos
109	plasmídio de aderência agregativa	B1	11/01/2000	Club de Campo Castelo
858	<i>eae</i>	A	21/02/2000	Ass. Func. Públ. Est. SP
868	plasmídio de aderência agregativa	A	21/02/2000	Pq. Estadual Guarapiranga
2156	Stx 2	A	17/04/2000	Marina Guaraci
2264	enterotoxina termo-lábil I	A	24/04/2000	Marina Guaraci
2265	plasmídio de aderência agregativa	A	24/04/2000	Ass. Func. Públ. Est. SP
1538	enterotoxina termo-lábil I	A	04/04/2001	Restaurante do Odair

sentaram resultado positivo com esta sonda. Outras 2 linhagens isoladas desta represa (2264 e 1538) hibridaram com a sonda LT-I, referente ao gene codificador da enterotoxina termo-lábil do tipo I, 2 (4102 e 858) hibridaram com a sonda *eae*, referente ao gene codificador da intimina (característica de EPEC, quando sozinha) e 1 (2156) hibridou com a sonda *stx*₂, referente ao gene codificador da toxina Shiga-2.

Em estudo realizado entre 1994 e 1997, na região de Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, Medeiros *et al.* (2001) identificaram o enteropatógeno EPEC como um dos principais agentes etiológicos da diarreia aguda, estando presente em 8,7% dos casos. Um estudo anterior realizado com crianças menores de 2 anos de idade com diarreia, no estado do Rio de Janeiro, havia isolado EPEC de 32,7% dos pacientes (Rosa *et al.*, 1998). Este virotipo de *E. coli* possui como principal fator de virulência, a proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, que foi identificado em duas linhagens (4102 e 858) isoladas na represa Guarapiranga. As linhagens que apresentam o gene *eae* mas não apresentam o plasmídeo EAF, são chamadas de EPEC atípicas (Kaper, 1996). Esta categoria mantém a habilidade das EPEC de causar lesões do tipo “attaching & effacing” (A/E) em cultura de tecido, além de causar agregação de actina, embora menos eficientemente do que as linhagens que possuem o plasmídeo. As EPEC atípicas já foram descritas como causadoras de diarreia em estudos epidemiológicos (Rosa *et al.*, 1998).

Seis linhagens (94, 878, 881, 109, 868 e 2265) apresentaram o plasmídeo de aderência, característico das *E. coli* enteroagregativas (EAEC). Esta categoria está associada a diarreia persistente e é considerada uma causa emergente de diarreia nos países em desenvolvimento (Gioppo *et al.*, 2000). Outras duas linhagens (2264 e 1538) apresentaram o gene codificador da enterotoxina termo-lábil I (LT-I), associada com a categoria enterotoxigênica (ETEC). Esta enterotoxina causa o aumento da concentração de AMPc dentro das células, levando a desregulação da concentração de íons cloreto e sódio na célula. As ETEC causam diarreia líquida sem sangue, vômito, náuseas, mas com ausência de febre (Gilligan, 1999; Kuhnert *et al.*, 2000) e são consideradas a principal causa de diarreia em países em desenvolvimento (Kuhnert *et al.*, 2000). Devido à desidratação profunda, a infecção por linhagens ETEC pode ser fatal em crianças (Gilligan, 1999).

Uma última linhagem (2156) apresentou o gene codificador da toxina Shiga-2 (Stx 2), característica das *E. coli* verotoxigênicas (VTEC). Esta toxina age inibindo a síntese protéica (Kuhnert *et al.*, 2000). As VTEC causam, durante as primeiras 24 a 48 horas, uma diarreia líquida, seguida por um aumento na dor intestinal e presença de sangue. Aproximadamente 10% das crianças infectadas desenvolvem a síndrome hemolítica-urêmica (Kuhnert *et al.*, 2000). Em 1999, na Escócia, Licence *et al.* analisaram linhagens O157 de *E. coli* isoladas de 6 pessoas envolvidas em uma epidemia desta bactéria. Todas as pessoas foram contaminadas por um suprimento de água sem tratamento. A análise dos tipos de toxinas presentes nas linhagens, mostrou que 4 das linhagens apresentavam apenas a toxina Shiga-2, assim como a linhagem 2156, analisada neste trabalho.

As linhagens 881 e 878 foram isoladas na represa Billings no mesmo dia (21/02/2000), porém em lugares diferentes. A primeira foi isolada no Jardim Los Angeles, enquanto que a segunda foi isolada no Parque Municipal. Já a linhagem 94 foi isolada na prainha em frente a ETE, no dia 11/01/2000. Duas destas linhagens pertencem ao grupo filogenético A (94 e 878) e 1 ao grupo B1 (881). As linhagens 878 e 94 apresentaram 72,29% de similaridade entre elas e menos de 45,0% de similaridade com a linhagem 881.

Entre as linhagens, isoladas na represa Guarapiranga, 2156, 1538, 868, 2264, 2265 e 858 pertencem ao grupo filogenético A e as linhagens 109 e 4102 pertencem aos grupos filogenéticos B1 e B2, respectivamente. As linhagens 2264 e 2265 foram isoladas no mesmo dia (24/04/2000), a primeira na Marina Guaraci e a segunda na Associação dos Funcionários Públicos do Estado de São Paulo. As linhagens 868 e 858 também foram isoladas no mesmo dia (21/02/2000), a primeira no Parque Estadual de Guarapiranga, e a outra na Associação dos Funcionários Públicos do Estado de São Paulo. A linhagem 2156 foi isolada no dia 17/04/2000, na Marina Guaraci, enquanto que a linhagem 1538 foi isolada no dia 04/04/2001, nas proximidades do Restaurante do Odair. A linhagem 4102, foi isolada no dia 05/10/1999, próximo ao Restaurante Interlagos, enquanto que a linhagem 109, foi isolada no dia 11/01/2000, no Club de Campo Castelo. Nenhuma das linhagens que apresentaram resultado positivo nos experimentos de hibridação pertencem ao grupo D. As linhagens 858, 868, 2264 e 2265 foram as que apresentaram as maiores similaridades, sendo que as linhagens 858 e 2264 apresentaram 63,63% de similaridade e as linhagens 868 e 2265, 64,49%.

Os resultados referentes aos experimentos de hibridação de colônias demonstram que o potencial patogênico das linhagens de *E. coli* estudadas não está relacionado com o polimorfismo gerado pelas técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR e nem com os grupos filogenéticos aos quais elas pertencem, uma vez que algumas linhagens com os mesmos fatores de virulência apresentaram baixa similaridade entre si e 3 delas pertenciam a grupos filogenéticos diferentes. Contudo, fatores de virulência extraintestinais não foram testados, sendo que estes, geralmente, estão relacionados às linhagens dos grupos B2 e D (Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000). As linhagens que apresentaram fatores de virulência não estão restritas a locais isolados nas represas, como pode ser visto nas Figuras 1 e 2. Por outro lado, 4 das 11 linhagens foram isoladas no mesmo dia (21/02/2000), 2 em cada represa. Três linhagens foram isoladas no mês de abril de 2000, sendo duas no mesmo dia (24/04) e outra uma semana antes (17/04). Outras 2 linhagens foram isoladas no dia 11/01/2000, uma em cada represa.

A presença de linhagens com seqüências relacionadas à fatores de patogenicidade nas águas das represas é um fator de risco para a saúde pública, uma vez que estas águas são amplamente utilizadas para recreação e consumo.

Uma grande variabilidade genética foi observada entre as linhagens analisadas, indicando a existência de diversos focos de contaminação nas represas Billings e Guarapiranga. As análises dos grupos filogenéticos das linhagens estudadas mostraram diferenças entre as linhagens isoladas das diferentes represas e os experimentos de hibridação de colônias demonstraram a existência de linhagens possuidoras de seqüências de fatores de patogenicidade entre as linhagens analisadas. Providências como o tratamento do esgoto despejado na água das represas são necessárias para a eliminação das linhagens potencialmente patogênicas presentes nestas águas, a fim de se garantir a qualidade das mesmas.

Bibliografia

- Ackman, D.; Marks, S.; Mack, P., Caldwell, M.; Root, T. & Birkhead G. (1997) Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of fresh water lake. **Epidemiol. Infect.** 119: 1-8.
- American Public Health Association (1998) Membrane filter technique for members of the coliform group. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA/AWWA/WEF, Washington. pp 9-56-9-67.
- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. (2000) BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 272p.
- Chalmers, R. M.; Aird, H. & Bolton, F. J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 124S-132S.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4555-4558.
- Dillon, W. R. & Goldstein, M. (1984) Multivariate analysis. Methods and applications John Wiley & Sons, New York.
- Dixon, P. M. (1993), The bootstrap and the jackknife: Describing the precision of ecological indices. in Scheiner, S. M. and Gurevitch, J., eds., Design and Analysis of Ecological Experiments. Chapman & Hall, New York. pp 290-318.
- Dombek, P. E.; Johnson, L. K.; Zimmerley, S. T. & Sadowsky, M. J. (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2572-2577.
- Duriez, P.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E.; Chaventré, A.; Elion, J.; Picard, B. & Denamur, E. (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetic distributed among geographically distinct human population. **Microbiol.** 147: 1671-1676.
- Efron, B. & Tibshirani, R. J. (1993) An Introduction to the Bootstrap. Chapman & Hall, New York.
- Everitt, B. S. (1977) The analysis of contingency tables. Chapman & Hall, London.
- Feldman, K. A.; Mohle-Boetani, J. C.; Ward, J.; Furst, K.; Abbott, S. L.; Ferrero, D. V.; Olsen, A. & Werner, S. B. (2002) A cluster of *Echerichia coli* O157:Nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. **Public Health Rep.** 117: 380-385.
- Fienberg, S. E. (1978) The analysis of cross-classified categorical data. MIT Press, Massachussets.
- Gilligan, P. H. (1999) *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clin. Lab. Med.** 19: 505-521.
- Gioppo, N. M. R.; Elias Jr., W. P.; Vidotto, M. C.; Linhares, R. E.; Saridakis, H. O.; Gomes, T. A. T.; Trabulsi, L. R. & Pelayo, J. S. (2000) Prevalence of Hep-2 cell-

- adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.** 190: 293-298.
- Goulet, Ph & Picard, B. (1986) Comparative esterase electrophoretic polymorphism of *Escherichia coli* isolates obtained from animal and human sources. **J. Gen. Microbiol.** 132: 1843-1851.
- Hoffmann, H.; Hornef, M. W.; Schubert, Soren & Roggenkamp (2001) Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** 291:227-230.
- Johnson, J. R. & Stell, A. L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise **J. Infect. Dis.** 181: 261-272.
- Kaper, J. B. (1996) Defining EPEC. **Rev. Microbiol.** 27 (suppl. 1): 130-133.
- Kuhnert, P.; Boerlin, P. & Frey, J. (2000) Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 107-117.
- Licence, K.; Oates, K. R.; Synge, B. A. & Reid, T. M. S. (2001) an outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiol. Infect.** 126:135-138.
- Maas, R. (1983) An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. **Plasmid** 10: 296-298.
- Manly, B. F. J. (1998) Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. Chapman and Hall, London.
- Martin, A. P. (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3673-3682.
- McCarthy, T. A.; Barrett, N. L.; Hadler, J. L.; Salsbury, B.; Howard, R. T.; Dingman, D. W.; Brinkman, C. D.; Bibb, W. F. & Cartter, M. L. (2001) Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. **Pediatrics** 108: E59.
- Medeiros, M. I. C.; Neme, S. N.; Silva, P.; Capuano, D. M.; Errera, M. C.; Fernandes, S. A.; Valle, G. R. & Avila, F. A. (2001) Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 43: 21-24.
- Orskov, F. (1981) *Escherichia coli*. in M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Truper; A. Balows & H. G. Shlegel (eds.) *The Prokaryotes: A Handbook on habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag. pp 1128-1134.
- Paulino, L. C.; Bergamo, R. F.; Mello, M. P.; Garcia Jr., O.; Manfio, G. P.; Ottoboni, L. M. M. (2001) Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mines wastes in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek** 80: 65-75.

- Paunio, M.; Pebody, R.; Keskimäki, M.; Kokki, M.; Ruutu, P.; Oininen, S.; Vuotari, V.; Siitonen, A.; Lahti, E. & Leinikki, P. (1999) Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. **Epidem. Infect.** 122: 1-5.
- Pearson, K. (1926) On the coefficient of racial likeness. **Biometrika** 18: 105-117.
- Picard, B.; Garcia, J. S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen, E.; Elion, J. & Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67: 546-553.
- Rademaker, J. L. W.; Hoste, B.; Louws, F. J.; Kerster, K.; Swings, J.; Vauterin, P. & de Bruijn, F. J. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50:665-677.
- Rosa, A. C. P.; Mariano, A. T.; Pereira, A. M. S.; Tibana, A.; Gomes, T. A. T. & Andrade, J. R. C. (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.** 47: 781-790.
- Sadowsky, M. J.; Kinkel, L. L.; Bowers, J. H. & Schottel, J. L. (1996) Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3489-3493.
- Samadpour, M.; Stewart, J.; Steingart, K.; Addy, C.; Louderback, J.; McGinn, M.; Ellington, J. & Newman, T. (2002) Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in Battle Ground Lake, Vancouver, Washington. **J. Environ. Health.** 64: 16-20.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Saylers, A. A. & Whitt, D. D. (1994) Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach. ASM Press. pp 190-204.
- Selenska-Pobell, S.; Otto, A.; Kutschke, S. (1998) Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and rep-APD. **J. Appl. Microbiol.** 84: 1085-1091.
- Simon, J. L. (1997) Resampling - The new statistics. On line book: <http://www.resample.com/content/text/> (consultado em setembro de 2002).
- Sokal, R. R. & Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. **Kans. Univ. Sci. Bull.** 38: 1409-1438.
- Swerdlow, D. L.; Woodruff, B. A.; Brady, R. C.; Griffing, P. M.; Tippen, S.; Donnell Jr., H. D.; Geldreich, E.; Payne, B. J.; Meyer Jr., A.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Bright, M.; Bean, N. H. & Blake, P. A. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Ann. Intern. Med.** 117: 812-819.
- Versalovic, J.; Koeuth, T. & Lupsky, J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** 19: 6823-6831.

- Vinuesa, P.; Rademaker, J. L.; deBruijn, F. J. & Werner, D. (1998) Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of gene encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2096-2104.
- Warner, M.; Kuo, K.; Williams, L.; Adam, B.; Langkop, C.; Ruden, R.; Francis, B. & Haupt, T. (1996) Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7: Illinois. **Mor. Mortal. Wkly. Rep.** 45: 437-439.
- World Health Organization (1996) Guidelines for drinking water quality – Health criteria and other supporting information. Vol. 2. Second ed. WHO. Geneva.

CAPÍTULO 2

**ANÁLISE DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE
LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS NOS RIOS
JAGUARI E SOROCABA**

Introdução

O rio Jaguari faz parte da UGRHI 05 – Bacia do Piracicaba. Esta bacia abrange a região declarada, por Decreto Estadual, como Área de Proteção Ambiental de Piracicaba. A bacia drena uma área de 11.400 km² e seus constituintes recebem efluentes domésticos e industriais. As águas desta bacia são utilizadas para abastecimento público, abastecimento industrial e irrigação de plantações. Entre os meses de maio a setembro de 2002, a qualidade das águas do rio Jaguari foi classificada pela CETESB como sendo ruim, tendo atingido, em uma escala de 1 a 100, as notas 32 no mês de maio e 27 nos meses de julho e setembro (www.cetesb.sp.gov.br).

O rio Sorocaba faz parte da Bacia Sorocaba, a qual integra a UGRHI 10. Esta bacia possui uma área de drenagem de 5.020 km² e, assim como a Bacia de Piracicaba, recebe efluentes domésticos e industriais, além de ser utilizada para abastecimento público e industrial, e para irrigar plantações. A qualidade das águas do rio Sorocaba manteve-se aceitável, segundo a CETESB, durante os meses de janeiro, março e julho de 2002, com notas 40, 37 e 42, respectivamente. Porém, nos meses de maio e setembro deste ano, a qualidade da água foi classificada como ruim, ao obter as notas 29 e 33, respectivamente (www.cetesb.sp.gov.br).

As águas de rios vêm-se mostrando importantes fontes de contaminação por *E. coli* em todo o mundo. Diversos autores já descreveram casos em que linhagens patogênicas de *E. coli* foram isoladas de rios, porém nenhum estudo até o momento tentou descrever quais os principais grupos filogenéticos encontrados nestas águas e como eles variam no tempo. Maule (2000) observou que o número de *E. coli* O157 em água de rio caía de 10⁶ células por mL para níveis indetectáveis em até 27 dias. Ohno *et al.* (1997) estudaram bactérias enteropatogênicas no rio La Paz, na Bolívia, e observaram um aumento na quantidade de bactérias nos locais mais próximos à foz do rio, onde há maior concentração humana. Simiyu *et al.* (1998) observaram a presença de linhagens da categoria ETEC no rio Nairobi, no Quênia. Müller *et al.* (2001) encontraram 10 linhagens de *E. coli* com os fatores de virulências Stx-1, Stx-2 e hemolisina nos rios Klip e Vaal, na África do Sul.

As linhagens patogênicas intestinais de *E. coli* pertencem, em sua maioria, ao grupos filogenéticos A, B1 e D, enquanto que as linhagens do grupo B2 causam,

geralmente, doenças extraintestinais (Pupo *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 1999). Como as linhagens comensais normalmente pertencem aos grupos A e B1 (Johnson *et al.*, 2001), a presença de linhagens dos grupos filogenéticos D e B2 entre linhagens de *E. coli* isoladas de águas de rios é um indicativo do risco potencial da utilização destas águas pelo homem.

Neste estudo, a distribuição dos grupos filogenéticos de linhagens de *E. coli* isoladas pela CETESB durante o ano de 2002, nos rios Jaguari e Sorocaba, foi determinada através da metodologia descrita por Clermont *et al.* (2000). Sessenta linhagens de *E. coli* isoladas no rio Jaguari, nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2002 e 68 isoladas no rio Sorocaba, nos meses de janeiro, março, maio, julho, setembro e novembro de 2002 foram utilizadas no estudo.

Material e Métodos

1. Linhagens bacterianas

Um total de 128 linhagens de *E. coli* foram isoladas pela CETESB, como descrito no Capítulo 1, dos rios Sorocaba e Jaguari. As 60 linhagens do rio Jaguari foram isoladas de um ponto rio abaixo, próximo a pocilgas (criação de porcos). As 68 linhagens do rio Sorocaba foram isoladas de um ponto rio abaixo, próximo a um matadouro de bovinos. As linhagens isoladas, os rios e as datas de coleta estão indicadas na Tabela 1. As linhagens de *E. coli* foram armazenadas e a massa celular foi obtida como descrito anteriormente (Capítulo 1).

Tabela 1: Linhagens de *E. coli* isoladas nos rios Sorocaba e Jaguari.

Local	Data de coleta	Número de linhagens
Rio Sorocaba	20/01/2002	9
	18/03/2002	8
	27/03/2002	10
	23/05/2002	10
	18/07/2002	10
	09/09/2002	10
	06/11/2002	11
Rio Jaguari	22/05/2002	9
	31/07/2002	10
	10/09/2002	10
	18/11/2002	31

2. Determinação dos grupos filogenéticos das linhagens

A determinação do grupo filogenético das linhagens foi realizada de acordo com Clermont *et al.* (2000), como descrito no Capítulo 1. Para algumas linhagens, a reação de PCR foi realizada utilizando-se o lisado bacteriano. Para isto, 10 µL da cultura permanente de cada linhagem foi inoculado em meio LB sólido (Sambrook *et al.*, 1989). Após o crescimento a 37°C durante a noite, parte do cultivo foi transferido para tubo eppendorf de 1,5 mL, contendo 100 µL de água Milli-Q estéril. Posteriormente, o tubo foi deixado em água fervente por 20 min e, depois, foi centrifugado por 5 min em microcentrífuga a 12.000 rpm. Para as reações de PCR foram utilizados 5 µL do sobrenadante. Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de 2,0% de agarose, contendo brometo de etídio, em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de peso molecular foi utilizado, no gel, o *Ladder* 100 bp (Gibco BRL). Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz U.V. e analisado.

3. Análises estatísticas

Os testes de Qui-quadrado foram realizados utilizando o programa Biostat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000), conforme descrito no Capítulo 1.

A frequência de cada grupo filogenético por rio e mês do ano foram organizadas em tabelas de contingência, analisadas através de modelos log-lineares (Everitt, 1977; Fienberg, 1978), como descrito no Capítulo 1.

Foram realizadas análises utilizando: todos os grupos e todos os meses separadamente; apenas os grupos A e B1 (mais frequentes) e todos os meses; grupos A e B1 e os meses agregados em maio/julho e setembro/novembro; grupos A e B1 e meses de maio e julho agregados e setembro e novembro separados; e grupos A e B1 e apenas os meses de setembro e novembro.

Resultados e discussão

Linhagens de *E. coli* isoladas nos rios Jaguari (60 linhagens) e Sorocaba (68 linhagens) tiveram os seus grupos filogenéticos determinados e analisados através da metodologia descrita por Clermont *et al.* (2000). A Figura 1 mostra um gel de agarose com exemplos dos resultados de determinação dos grupos filogenéticos.

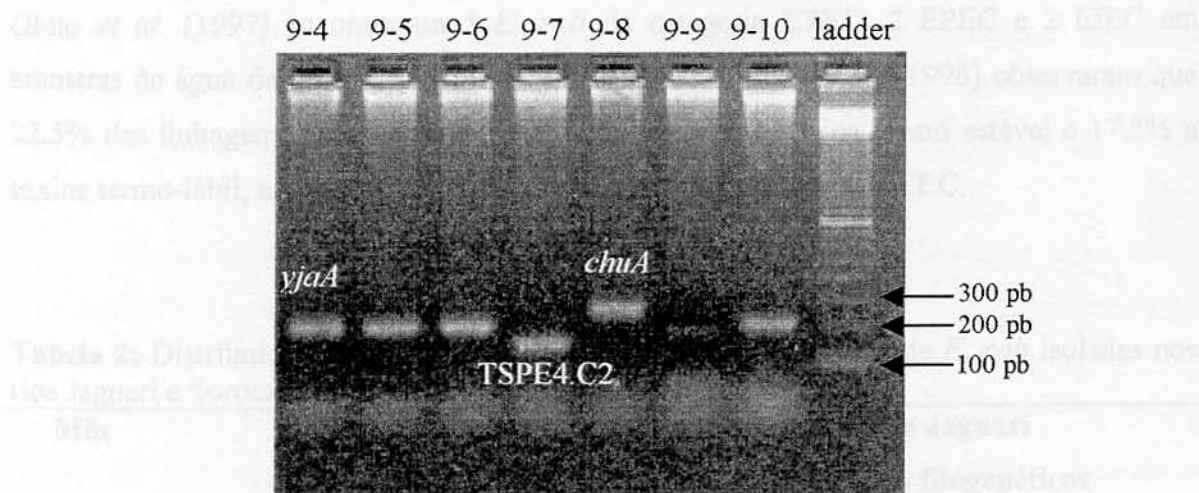


Figura 1: Gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio, mostrando amplificações dos fragmentos *chuA*, *yjaA* e TSPE4.C2 em algumas linhagens selecionadas.

Das 60 linhagens isoladas no rio Jaguari, 42 (70%) pertencem ao grupo filogenético A, 13 (21,7%) ao B1 e 5 (8,3%) ao D. Com relação às linhagens isoladas no rio Sorocaba, das 68 linhagens analisadas, 45 (66,2%) pertencem ao grupo A, 14 (20,6%) ao B1, 8 (11,7%) ao D e 1 (1,5%) ao B2 (Tabela 2).

Treze linhagens isoladas nos dois rios pertencem ao grupo D e 1 isolada no rio Sorocaba pertence ao grupo B2. As linhagens destes grupos são, em sua maioria, patogênicas. As linhagens do grupo B2 são, geralmente, patogênicas extraintestinais

(categoria ExPEC) e possuem diversos fatores de virulência como, adesinas, toxinas, cápsulas e outros (Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000). As ExPEC podem causar meningite neonatal, infecções intra-abdominais e osteomielite (Johnson & Russo, 2002). Já o grupo filogenético D inclui linhagens patogênicas como a linhagem O157, da categoria VTEC (Clermont *et al.*, 2000). A O157 é uma linhagem altamente virulenta, podendo causar diversas doenças como diarreia, síndrome hemolítica-urêmica e colite hemorrágica (Parry & Palmer, 2000). A presença de linhagens patogênicas em rios já foi descrita por outros autores. Na África do Sul, Müller *et al.* (2001) encontraram genes para os fatores de virulência Stx I, Stx II e hemolisina entre linhagens de *E. coli* isoladas dos rios Klip e Vaal. Ohno *et al.* (1997) encontraram 5 *E. coli* da categoria ETEC, 2 EPEC e 2 EIEC em amostras de água de um rio na Bolívia. No Quênia, Simiyu *et al.* (1998) observaram que 22,5% das linhagens isoladas do rio Nairobi possuíam a toxina termo estável e 17,5% a toxina termo-lábil, ambas características de linhagens da categoria ETEC.

Tabela 2: Distribuição dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba em 2002.

Mês	Rio Sorocaba				Rio Jaguari			
	Grupos filogenéticos				Grupos filogenéticos			
	A	B1	B2	D	A	B1	B2	D
Janeiro	7	2	0	0	Não amostrado			
Março	5	1	1	1	Não amostrado			
Março	8	1	0	1	Não amostrado			
Mai	4	3	0	3	8	1	0	0
Julho	4	3	0	3	7	2	0	1
Setembro	9	1	0	0	10	0	0	0
Novembro	8	3	0	0	17	10	0	4
Total	45	14	1	8	42	13	0	5

Além da presença de linhagens de *E. coli* patogênicas na água, diversos autores vêm investigando meios de se determinar a origem (animal ou humana) destas linhagens (Turner *et al.*, 1997; Parveen *et al.*, 1999; Dombek *et al.*, 2000). Goullet & Picard (1986) observaram porcentagens diferentes de linhagens do grupo B2 entre isolados de origem animal e humana. Estes autores sugerem que apenas 1,6% das linhagens isoladas de animais pertencem ao grupo B2, enquanto que entre as linhagens isoladas de humanos, 9% pertencem a este grupo. Apesar de não ter sido encontrada linhagem do grupo B2 no rio Jaguari, a porcentagem de linhagens deste grupo, no rio Sorocaba (1,47%), está muito próximo ao descrito para isolados comensais de animais (1,6%) ($\chi^2 = 0,009$; G. L. = 1; $p=0,9234$). Este resultado vem confirmar a suspeita de que as principais fontes de contaminação neste rio são de origem animal, e não humana. O ponto onde foram realizadas as coletas é próximo a criações de bovinos, que podem estar contaminando este rio.

Modelos log-lineares foram utilizados na análise das interações entre as variáveis: rio, grupo filogenético e mês da coleta. Através destas análises, não foi observada nenhuma relação entre os grupos filogenéticos e os rios ($p > 0,3$). Contudo, observou-se uma correlação entre rio e mês do ano, principalmente quando os meses de maio e julho foram agregados e comparados aos meses de setembro e novembro ($p < 0,045$), e quando se comparou apenas o mês de setembro ao mês de novembro ($p < 0,025$) (Tabela 3). Nos dois rios houve mais linhagens de B1 do que o esperado pelo acaso em novembro, e menos no mês de setembro. Estes desvios foram mais acentuados no rio Jaguari do que no rio Sorocaba. Estes resultados sugerem que há uma variação sazonal na distribuição dos grupos filogenéticos entre as linhagens, e que esta variação é semelhante nos dois rios estudados.

Observou-se, ainda, uma grande porcentagem de linhagens do grupo filogenético A entre as linhagens isoladas no rio Jaguari (70%), o mesmo acontecendo entre as linhagens isoladas do rio Sorocaba (64,9%). Através da análise utilizando o teste de Qui-Quadrado, observou-se que a distribuição das linhagens entre os grupos filogenéticos não é significativamente diferente entre as linhagens dos dois rios ($\chi^2 = 0,786$; G. L. = 2; $p=0,6749$).

Tabela 3: Desvios padrão¹ do modelo log-linear que testa a correlação entre grupo filogenético e mês, nos rios Jaguari e Sorocaba.

Mês	Grupos filogenéticos – rio Jaguari		Grupos filogenéticos – rio Sorocaba	
	A	B1	A	B1
Setembro	0,92610	-1,47755	0,303779	-0,576380
Novembro	-0,580464	0,926101	-0,290846	0,551841

¹Desvio padrão = (Observado-Esperado)/(Esperado)²

Quando comparadas com as linhagens isoladas nas duas represas, as linhagens isoladas nos dois rios, apresentaram diferença significativa na distribuição das linhagens entre os grupos filogenéticos ($\chi^2 = 6,978$; G. L. = 2; $p = 0,0305$). Comparando-se individualmente, apenas a represa Billings apresentou diferenças significativas nas distribuições tanto com relação ao rio Jaguari quanto com o rio Sorocaba ($\chi^2 = 12,153$; G. L. = 2; $p = 0,0023$ e $\chi^2 = 8,358$; G. L. = 2; $p = 0,0153$, respectivamente). Hoffman *et al.* (2001) observaram que 30% das linhagens de *E. coli* isoladas de água superficiais, na Alemanha, possuíam o gene *chuA*. Esta frequência não foi confirmada em nossas análises, em nenhum dos rios. O rio Sorocaba apresentou 13,24% e o rio Jaguari 8,33% de linhagens com este fragmento. Estes valores são estatisticamente diferentes de 30% ($\chi^2 = 13,413$; G. L. = 1; $p = 0,0002$, rio Jaguari e $\chi^2 = 16,643$; G. L. = 1; $p < 0,0001$, rio Sorocaba). A baixa proporção de linhagens contendo este fragmento nos dois rios sugere que as contaminações sejam predominantemente de origem animal, uma vez que o fragmento *chuA* parece estar envolvido com a colonização do hospedeiro humano (Hoffman *et al.*, 2001).

A análise dos grupos filogenéticos entre as linhagens de *E. coli* isoladas nos rios Sorocaba e Jaguari mostrou que estes dois rios são semelhantes no que diz respeito à distribuição de linhagens nos grupos. A presença de linhagens dos grupos B2 e D é preocupante já que estes grupos incluem linhagens patogênicas intestinais, como a O157, e extraintestinais (ExPEC).

Bibliografia

- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. (2000) BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 272p.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4555-4558.
- Dombek, P. E.; Johnson, L. K.; Zimmerley, S. T. & Sadowsky, M. J. (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2572-2577.
- Everitt, B. S. (1977) The analysis of contingency tables. Chapman & Hall, London.
- Fienberg, S. E. (1978) The analysis of cross-classified categorical data. MIT Press, Massachussets.
- Goullet, Ph & Picard, B. (1986) Comparative esterase electrophoretic polymorphism of *Escherichia coli* isolates obtained from animal and human sources. **J. Gen. Microbiol.** 132: 1843-1851.
- Hoffmann, H.; Hornef, M. W.; Schubert, Soren & Roggenkamp (2001) Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** 291:227-230.
- Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.** 139: 155-162.
- Johnson, J. R. & Stell, A. L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181: 261-272.
- Johnson, J. R.; Delavari, P.; Kuskowski, M. & Stell, A. L. (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 183: 78-88.
- Maule, A. (2000) Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 71S-78S.
- Müller, E. E.; Ehlers, M. M. & Grabow, W. O. K. (2001) The occurrence of *E. coli* O157:H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption. **Wat. Res.** 35: 3085-3088.
- Ohno, A.; Marui, A.; Castro, E. S.; Reyes, A. A. B.; Elio-Calvo, D.; Kasitani, H.; Ishii, Y. & Yamaguchi, K. (1997) Enteropathogenic bacteria in the La Paz river of Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 57: 438-444.
- Parry, S. M. & Palmer, S. R. (2000) The public health significance of VTEC O157. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 1S-9S.
- Parveen, S.; Portier, K. M.; Robinson, K.; Edmiston, L. & Tamplin, M. I. (1999) Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating

- human and nonhuman sources of fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3142-3147.
- Picard, B.; Garcia, J. S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen, E.; Elion, J. & Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67: 546-553.
- Pupo, G. M.; Karaolis, D. K. R.; Lan, R. & Reeves, P. R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infect. Immun.** 65: 2685-2692.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Simiyu, K. W.; Gathura, P. B.; Kyule, M. N.; Kanja, L. W. & Ombui, J. N. (1998) Toxin production and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* river water isolates. **East Afr. Med. J.** 75: 699-702.
- Turner, S. J.; Lewis, G. D. & Bellamy, A. R. (1997) A genomic polymorphism located downstream of the *gcvP* gene of *Escherichia coli* that correlates with ecological niche. **Mol. Ecol.** 6: 1019-1032.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA, PRESENÇA
DE FATORES DE PATOGENICIDADE E GRUPOS
FILOGENÉTICOS EM LINHAGENS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO
HUMANO NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Introdução

As águas destinadas ao consumo humano devem ser constantemente monitoradas com relação à presença de coliformes, como *Escherichia coli*, pois esses podem oferecer risco constante para a saúde das pessoas. Nos Estados Unidos, entre janeiro de 1999 e dezembro de 2000, 39 epidemias relacionadas à água de consumo foram reportados em 25 estados, causando doenças em 2068 pessoas e ocasionando duas mortes. Destes 39 casos, 20 foram associados a patógenos, 2 a produtos químicos e 17 não tiveram a causa identificada (Lee *et al.*, 2002). Em Trinidad e Tobago, 47% das amostras de água, destinadas ao consumo humano, coletadas em uma comunidade urbana continham coliformes (Agard *et al.*, 2002). Outros autores também vêm relatando casos de contaminação por *E. coli* através do consumo da água (Yarze & Chase, 2000; Licence *et al.*, 2001; Yatsuyanagi *et al.*, 2002) em vários países como Japão, Estados Unidos e Escócia.

A presença, em águas tratadas, de coliformes é um grande problema enfrentado pelas empresas produtoras e distribuidoras de água de consumo e autoridades sanitárias. Este grupo de bactérias engloba tradicionalmente além da *E. coli*, bactérias do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. As rachaduras presentes nas tubulações da rede muitas vezes são imperceptíveis e não detectadas, permitindo a infiltração de esgoto ou solo e resultando na presença de coliformes na água tratada (Camper *et al.*, 1991). A formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água de consumo humano gera uma cadeia alimentar que resulta no crescimento de organismos incompatíveis com a qualidade da água (Sibille *et al.*, 1998). Entre os organismos que podem ser encontrados na água potável, além de bactérias, estão os fungos, protozoários, algas, nematóides e outros (Sibille *et al.*, 1998).

Um outro ponto crítico para a área de saneamento e órgãos de controle de poluição é a diferenciação da poluição fecal de origem humana e animal. Geldreich & Kenner (1969) propuseram a utilização da razão das densidades de coliformes fecais/estreptococos fecais para se determinar se a contaminação era de origem humana ou animal. Dombek *et al.* (2000) utilizaram BOX-PCR para diferenciar linhagens de *E. coli* de origem animal e de origem humana, obtendo relativo sucesso. Parveen *et al.* (1999) tentaram realizar esta mesma diferenciação através da técnica de ribotipagem. Como conclusão, estes autores

mencionaram que as linhagens isoladas de animais possuem maior variabilidade genética do que as linhagens de origem humana.

O estudo da variabilidade genética de linhagens bacterianas utilizando as técnicas de rep-PCR vem sendo realizado por diversos autores (Dombek *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2002). Dombek *et al.* (2000) e Moura *et al.* (2001) utilizaram estas técnicas para estudar a variabilidade genética de linhagens de *E. coli* isoladas de animais e humanos. A técnica de rep-PCR é bastante eficaz na diferenciação de linhagens, porém outras abordagens, mais abrangentes, podem ser utilizadas. A análise da distribuição dos grupos filogenéticos entre linhagens de *E. coli* permite, além da diferenciação das linhagens em 4 grupos, identificar possíveis linhagens patogênicas.

As linhagens de *E. coli* foram separadas em 4 grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D), segundo estudos realizados por Selander *et al.* (1986) e Herzer *et al.* (1990). Geralmente, as linhagens comensais pertencem aos grupos A e B1 (Johnson *et al.*, 2001). As linhagens patogênicas extra-intestinais pertencem em sua maioria ao grupo B2 e, em menor proporção ao grupo D (Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000), enquanto que as linhagens patogênicas intestinais pertencem, geralmente, aos grupos A, B1 e D (Pupo *et al.*, 1997).

Neste trabalho, 19 linhagens isoladas de águas tratadas e bruta, destinadas ao consumo humano tiveram os seus DNAs genômicos amplificados pelas técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR, a fim de se determinar a variabilidade genética das mesmas. Outras 6 linhagens isoladas de animais e 5 isoladas de humanos foram utilizadas para posterior comparação com as linhagens isoladas de água. Híbridações de colônias foram realizadas com o intuito de identificar possíveis genes para fatores de virulência intestinais nestas linhagens. As 19 linhagens de *E. coli* previamente analisadas e mais 30 linhagens posteriormente isoladas de água bruta (poço, nascente e mineral) tiveram os seus grupos filogenéticos determinados através da técnica descrita por Clermont *et al.* (2000).

Material e métodos

1. Linhagens bacterianas

Quarenta e nove linhagens de *E. coli* foram isoladas de água de consumo, pela CETESB, em exames de rotina, realizados no Estado de São Paulo. O processo de isolamento e preservação foi realizado como descrito no Capítulo 1. A Tabela 1 apresenta as datas de coleta, o tipo de água e os locais das coletas das linhagens utilizadas nos experimentos de rep-PCR e hibridação de colônias. A Tabela 2 mostra o número de linhagens utilizadas nos experimentos de análise dos grupos filogenéticos.

2. Caracterização por rep-PCR

As técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR foram realizadas conforme descrito no Capítulo 1.

3. Análise do potencial patogênico das linhagens

Para análise do potencial patogênico das linhagens foi utilizado o método de hibridação de colônias (Maas, 1983). A preparação dos filtros, marcação da sonda, hibridação e lavagem dos filtros estão descritos no Capítulo 1.

4. Determinação dos grupos filogenéticos das linhagens

A determinação do grupo filogenético das linhagens foi realizada de acordo com Clermont *et al.* (2000), como descrito no Capítulo 1. Para algumas linhagens, a reação de PCR foi realizada utilizando-se lisados celulares. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no Capítulo 2.

Tabela 1: Procedência das linhagens de *Escherichia coli* isoladas de água bruta e tratada destinada ao consumo humano.

Amostra	Data da coleta	Tipo de água	Local da coleta
1768	29/01/96	Bruta	Torneira da saída do poço Rio Pequeno, São Paulo, SP
2439	07/02/96	Tratada	Torneira do cavalete-residência, Santana, SP
2911	15/02/96	Tratada	Caixa d'água, Clínica Médica, Santo Amaro, São Paulo, SP
5798	15/04/96	Bruta	Poço (100 metros) Quiosque escola particular, Jardim Glória, São Paulo, SP
6047	18/04/96	Tratada	Bebedouro, Fábrica, Ribeirão Pires, SP
6689	29/04/96	Bruta	Poço (100 metros), reservatório, Vila Beatriz, São Paulo, SP
6967	02/06/96	Bruta	Mina, Valinhos, SP
7944	27/05/96	Tratada	Torneira cavalete-residência, Osasco, SP
8089	28/05/96	Tratada	Torneira cavalete-residência, Barueri, SP
8600	03/06/96	Bruta	Poço área rural, Juquitiba, SP
8703	03/06/96	Bruta	Poço fábrica, Mogi das Cruzes, SP
9243	12/06/96	Tratada	Torneira fábrica, Ibirapuera, São Paulo, SP
10214	25/06/96	Tratada	Torneira cavalete residência, Mairiporã, SP
10457	27/06/96	Bruta	Mina reservatório, Cotia, SP
15750	24/10/96	Bruta	Mina escola, Jundiaí, SP
16714	06/12/96	Tratada	Reservatório condomínio residencial, Maresias, São Sebastião, SP
16716	06/12/96	Tratada	Torneira cavalete residência, Barra do Sahy, São Sebastião, SP
16983	23/12/96	Tratada	Fonte água clorada, Barueri, SP
23341	23/11/95	Bruta	Poço, São Bernardo do Campo, SP

Tabela 2: Linhagens isoladas de água de consumo humano¹ utilizadas na análise dos grupos filogenéticos.

Tipo de água	Quantidade de linhagens
Tratada	10
Poço	18
Nascente	14
Mineral	7

¹ Todas as linhagens foram isoladas de locais diferentes e/ou em dias diferentes.

5. Análises estatísticas

Foram realizados testes de Qui-quadrado utilizando o programa Biostat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000), como descrito no Capítulo 1.

Resultados e discussão

1. Análise da variabilidade genética e do potencial patogênico das linhagens

A variabilidade genética de 31 linhagens de *E. coli*, sendo 9 isoladas de água bruta e 10 de água tratada, 3 de fezes de suínos, 3 de fezes de bovinos, 5 de fezes humanas e a linhagem de laboratório DH5 α foi analisada através de BOX-, ERIC- e REP-PCR. As linhagens de origem animal foram analisadas para comparação com as linhagens isoladas de água de consumo.

Uma grande variabilidade foi observada entre as linhagens de *E. coli*. O tamanho dos fragmentos amplificados com o *primer* de BOX variaram de 300 a 3,000 pb. Padrões de bandas complexos foram observados para as diferentes linhagens analisadas. Uma banda de aproximadamente 1,000 pb foi encontrada em todas as linhagens analisadas. O tamanho dos fragmentos amplificados com os *primers* de ERIC variaram de 200 a 6,100 pb. As bandas de DNA amplificadas através de REP-PCR variaram de 220 a 5,000 pb, aproximadamente.

Como mostra o dendrograma da Figura 1, foram formados 3 grupos por poucas linhagens, com similaridade entre 60% e 70%. O primeiro incluiu as linhagens 6047 (água tratada), 23341 (água bruta) e sc0726 (fezes humanas). O segundo grupo incluiu 2 linhagens de água tratada (16983 e 2439) e 1 de água bruta (6689). O último grupo incluiu 1 linhagem de água tratada (16714), 1 de água bruta (8600) e 2 de fezes humanas (cetesb14 e cetesb5). A porcentagem de similaridade entre as 2 linhagens de fezes humanas foi 91,8%.

Dois grupos grandes, ambos com similaridade ao redor de 60%, podem ser observados no dendrograma (Figura 1). Um dos grupos incluiu linhagens isoladas de fezes de animais (bov42, bov64, bov33 e sui110), linhagens isoladas de água bruta (8703, 5798, e 6967) e tratada (16716, 2911, 9243, 7944 e 8089). Dentro deste grupo, as linhagens que apresentaram maior similaridade foram: bov42, bov64 e 16716 (81,1% de similaridade); 2911 e 9243 (80,8% de similaridade); 8089 e bov33 (82,9% de similaridade). O outro grupo apresentou maior heterogeneidade, já que agrupou linhagens isoladas de fezes humanas (cetesb6 e sc0727); linhagens isoladas de fezes animais (sui156 e sui157); linha-

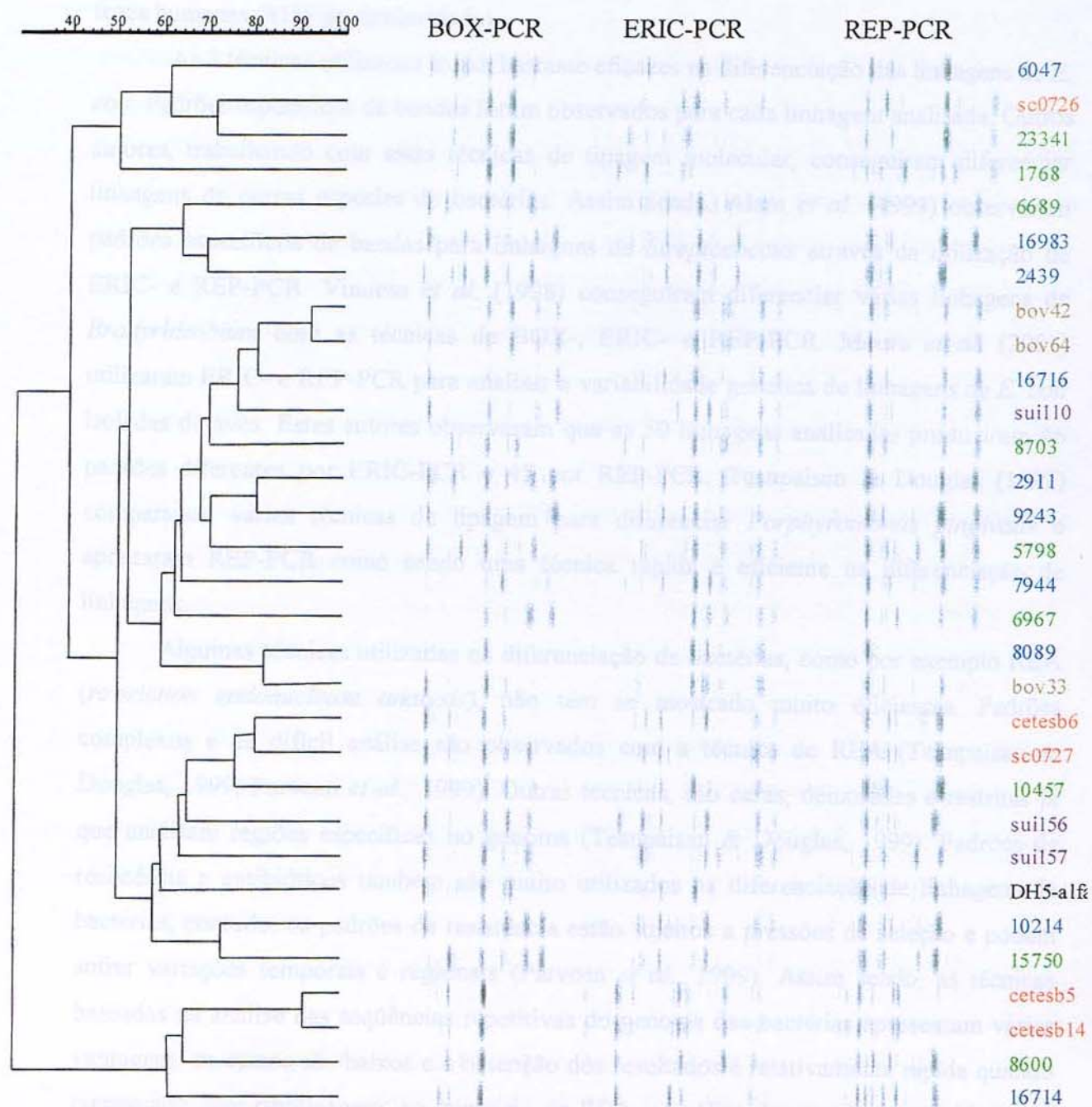


Figura 1: Dendrograma das linhagens de *E. coli*, obtido através da análise combinada dos resultados de BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR. Cores correspondentes a origem das linhagens: água tratada, água bruta, suínos, bovinos e humanos.

gens de água bruta (10457 e 15750); linhagem de água tratada (10214) e a linhagem de laboratório DH5 α . As 2 linhagens mais similares dentro deste grupo foram as isoladas de fezes humanas (81% de similaridade).

As 3 técnicas utilizadas foram bastante eficazes na diferenciação das linhagens de *E. coli*. Padrões específicos de bandas foram observados para cada linhagem analisada. Outros autores, trabalhando com estas técnicas de tipagem molecular, conseguiram diferenciar linhagens de outras espécies de bactérias. Assim sendo, Alam *et al.* (1999) observaram padrões específicos de bandas para linhagens de *Streptococcus* através da utilização de ERIC- e REP-PCR. Vinuesa *et al.* (1998) conseguiram diferenciar várias linhagens de *Bradyrhizobium* com as técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR. Moura *et al.* (2001) utilizaram ERIC- e REP-PCR para analisar a variabilidade genética de linhagens de *E. coli* isoladas de aves. Estes autores observaram que as 50 linhagens analisadas produziram 46 padrões diferentes por ERIC-PCR e 45 por REP-PCR. Teanpaisan & Douglas (1999) compararam várias técnicas de tipagem para diferenciar *Porphyromonas gingivalis* e apontaram REP-PCR como sendo uma técnica rápida e eficiente na diferenciação de linhagens.

Algumas técnicas utilizadas na diferenciação de bactérias, como por exemplo REA (*restriction endonuclease analysis*), não têm se mostrado muito eficientes. Padrões complexos e de difícil análise são observados com a técnica de REA (Teanpaisan & Douglas, 1999; Parveen *et al.*, 1999). Outras técnicas, são caras, demoradas e restritas já que analisam regiões específicas no genoma (Teanpaisan & Douglas, 1999). Padrões de resistência a antibióticos também são muito utilizados na diferenciação de linhagens de bactérias, contudo, os padrões de resistência estão sujeitos a pressões de seleção e podem sofrer variações temporais e regionais (Parveen *et al.*, 1999). Assim sendo, as técnicas baseadas na análise das seqüências repetitivas do genoma das bactérias apresentam várias vantagens: os custos são baixos e a obtenção dos resultados é relativamente rápida quando comparado com ribotipagem; ao contrário de REA, a análise dos resultados obtidos com estas técnicas é rápida e não estão sujeitas a pressões de seleção como no caso da resistência a antibióticos (Teanpaisan & Douglas, 1999; Parveen *et al.*, 1999).

Vários autores vêm tentando diferenciar linhagens de *E. coli* provenientes de hospedeiros diferentes. Parveen *et al.* (1999) utilizaram ribotipagem para diferenciar

linhagens de *E. coli* provenientes de humanos e animais. Parveen *et al.* (1999) mencionaram que as linhagens de origem animal apresentavam maior variabilidade do que as de origem humana. Turner *et al.* (1997) mencionaram um provável marcador molecular, próximo ao gene *gcvP*, capaz de diferenciar entre linhagens isoladas de humanos e animais. Este marcador foi detectado em 60% das linhagens de origem humana e em apenas 5% das linhagens isoladas de fezes de bovinos e ovinos (Turner *et al.*, 1997). Dombek *et al.* (2000) conseguiram, com relativo sucesso, diferenciar linhagens de *E. coli* isoladas de diferentes animais e humanos através da técnica de BOX-PCR. Em nossos experimentos não foi detectado, através de BOX-, ERIC- ou REP-PCR, nenhum fragmento de DNA amplificado que pudesse ser utilizado como marcador na diferenciação entre linhagens de origem humana e animal.

Levando em consideração nosso levantamento bibliográfico, este trabalho é o primeiro que analisa, ao nível molecular, a variabilidade genética de linhagens de *E. coli* isoladas de água destinada ao consumo humano. Uma grande variabilidade foi observada entre as linhagens isoladas de água tratada, sugerindo a existência de diversos focos de contaminação neste tipo de água, o que não deveria estar acontecendo. A presença de *E. coli* em água tratada é preocupante, já que a *E. coli* é o principal indicador de contaminação de água e diversos patógenos podem estar vinculados à presença desta bactéria (Orskov, 1981; Swerdlow *et al.*, 1992; *World Health Organization*, 1996). Quanto à diversidade observada entre as linhagens de água bruta, esta já era esperada se levarmos em consideração que estas águas não sofreram nenhum tipo de tratamento. Contudo, sabendo-se que estas águas também são utilizadas no consumo humano, a presença de *E. coli* não deixa de ser preocupante.

As linhagens mostradas na Tabela 1 foram submetidas a experimentos de hibridação de colônias utilizando as sondas *bfpA* (*bundle-forming pilus*), EAF (fator de aderência de EPEC), *eae* (gene codificador da intimina), *stx₁* (gene da toxina Shiga-1), *stx₂* (gene da toxina Shiga-2), INV (fator de invasão de EIEC), LT I (enterotoxina termo-lábil do tipo I), STh (enterotoxina termo-estável de origem humana), ST-Ip (enterotoxina termo-estável de origem suína) e AA (plasmídeo de aderência de EAEC). Nenhuma linhagem isolada de água de consumo apresentou resultado positivo nos experimentos de hibridação de colônias

realizados. Contudo, 2 linhagens isoladas de humanos (cetesb5 e cetesb14) apresentaram o gene codificador da intimina. Estas duas linhagens apresentaram 91,8% de similaridade.

2. Análise dos grupos filogenéticos das linhagens

Com o isolamento de novas linhagens de água de consumo pela CETESB, 49 linhagens de *E. coli* isoladas a partir de água destinada ao consumo humano tiveram os seus grupos filogenéticos determinados através da metodologia descrita por Clermont *et al.* (2000). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos. Apenas 2 linhagens analisadas pertencem ao grupo B2, uma isolada de água tratada e a outra isolada de água bruta de nascente. As linhagens do grupo B2 são, geralmente, patogênicas extraintestinais e possuem fatores de virulência como hemolisinas, adesinas, invasinas e outros. Estas linhagens são encontradas em 40 a 72% dos casos de infecção extraintestinal (Duriez *et al.*, 2001).

Das 9 linhagens isoladas de água tratada restantes, 3 pertencem ao grupo A, 4 ao grupo B1 e 2 ao grupo D. Entre as 18 linhagens isoladas de poço, nove pertencem ao grupo B1 (50%), a maior proporção de linhagens deste grupo dentre os tipos de água analisados. Outras 6 linhagens pertencem ao grupo A (33,3%) e 3 ao grupo D (16,7%). Sete linhagens foram isoladas de água mineral. A água mineral foi o tipo de água que apresentou a maior proporção de linhagens do grupo A 57,1% (4 linhagens isoladas). Além destas, 2 linhagens pertencem ao grupo B1 e 1 ao grupo D.

Foram analisadas 14 linhagens isoladas de nascente. Entre estas linhagens, 2 pertencem ao grupo A (14,3%), 4 ao grupo B1 (28,6%) e 7 ao grupo D (50%). A frequência de 50% de linhagens do grupo filogenético D em água de nascente foi a maior entre os tipos de água analisados. A alta frequência de linhagens do grupo D em águas de nascente é preocupante já que as linhagens deste grupo são, geralmente, patogênicas (Johnson & Russo, 2002), como a linhagem O157:H7 que pode causar, além da diarreia, a síndrome hemolítica-urêmica e colite hemorrágica (Parry & Palmer, 2000; Clermont *et al.*, 2000). Esta linhagem tem sido associada a diversos casos de infecção, principalmente em países desenvolvidos (Swerdlow *et al.*, 1992; Chalmers *et al.*, 2000; Parry and Palmer, 2000; Yarze & Chaze, 2000; Licence *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 2002; Samadpour *et al.*, 2002).

Entre 1992 e julho de 1999, 233 casos confirmados de epidemia por O157 através da água haviam sido publicados, em todo o mundo (Chalmers *et al.*, 2000). Em 2000, Yarze & Chaze publicaram um trabalho onde descrevem um caso de contaminação por *E. coli* O157 através do consumo de água de um poço, nos Estados Unidos. Mais de 1000 pessoas apresentaram diarreia e 2 morreram devido à síndrome hemolítica-urêmica.

Tabela 3: Quantidade de linhagens pertencentes a cada grupo filogenético (A, B1, B2 e D). Entre parêntese encontra-se a proporção relativa em %.

Tipo de água	Grupos Filogenéticos			
	A	B1	B2	D
Tratada	3 (30)	4 (40)	1 (10)	2 (20)
Poço	6 (33,3)	9 (50)	0	3 (16,6)
Nascente	2 (14,3)	4 (28,6)	1 (7,1)	7 (50)
Mineral	4 (57,1)	2 (28,6)	0	1 (14,3)

Comparando as frequências de linhagens de cada grupo filogenético nos diferentes tipos de água (tratada, nascente, poço e mineral), não foram observadas diferenças significativas entre eles. Apenas as distribuições das linhagens isoladas de poço e de nascente apresentaram uma certa diferença, quando comparadas uma com a outra ($\chi^2=5,786$; G. L. = 2; $p = 0,0554$), embora não significativa. Como descrito anteriormente, estes tipos de água (poço e nascente) haviam apresentado as maiores proporções de linhagens dos grupos B1 e D, respectivamente.

Através de testes de Qui-Quadrado, foram realizadas comparações entre as distribuições dos grupos filogenéticos entre as linhagens isoladas de água de consumo, represas e rios. As distribuições dos grupos filogenéticos entre as linhagens isoladas a partir de água destinada ao consumo humano apresentaram diferenças significativas com relação às distribuições das linhagens isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba. As diferenças foram observadas tanto quando as linhagens dos dois rios foram analisadas em conjunto

($\chi^2=21,216$; G. L. = 2; $p > 0,0001$) quanto separadas ($\chi^2 = 14,556$; G. L. = 2; $p = 0,0007$, rio Sorocaba e $\chi^2=17,988$; G. L. = 2; $p=0,0001$, rio Jaguari), indicando que, entre as linhagens analisadas, há diferenças nas distribuições das linhagens de *E. coli* entre os grupos filogenéticos dos rios Jaguari e Sorocaba e das águas de consumo. Esta diferença pode ser devido a vários fatores como diferentes origens de contaminação, seleção diferencial das linhagens nos rios com relação às linhagens de água de consumo, ou erro de amostragem. Quando comparadas às linhagens isoladas nas represas, a distribuição entre os grupos filogenéticos não apresentou diferença significativa com relação às linhagens isoladas na represa Billings ($\chi^2=2,56$; G. L. = 2; $p = 0,2780$). Por outro lado, as linhagens isoladas na represa Guarapiranga apresentaram diferença significativa na distribuição entre os grupos filogenéticos ($\chi^2=13,495$; G. L. = 2; $p = 0,0012$). Estes resultados sugerem que as linhagens isoladas a partir de água destinada ao consumo humano possuem uma distribuição semelhante à apresentada pelas linhagens isoladas na represa Billings, analisadas neste trabalho (Capítulo 1).

Hoffman *et al.* (2001) observou uma frequência de 30% de linhagens de *E. coli*, isoladas de águas superficiais, portadoras do gene *chuA*. Em nosso trabalho, 31,6% das linhagens isoladas de água de consumo apresentaram o fragmento do gene *chuA*, proporção estatisticamente igual a de 30%, descrita por Hoffmann *et al.* (2001) ($\chi^2=0.008$; G. L. = 1; $p=0.9290$). Este resultado contrapõe-se com os resultados observados para as linhagens isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba, onde as linhagens não apresentaram a proporção de 30% de portadoras do gene *chuA*, descrita por Hoffman *et al.* (2001).

Este é o primeiro trabalho a determinar quais os grupos filogenéticos de *E. coli* predominantes entre linhagens isoladas de água de consumo. Os resultados aqui apresentados indicam uma alta diversidade de linhagens nas águas de consumo analisadas e um fator de risco potencial para a saúde humana, já que 30,6% das linhagens estudadas são de grupos filogenéticos que comumente incluem linhagens patogênicas intestinais e extraintestinais.

Bibliografia

- Agard, L.; Alexander, C.; Green, S.; Jackson, M.; Patel, S. & Desiyun, A. (2002) Microbial quality of water supply to an urban community in Trinidad. **J. Food Prot.** 65: 1297-1303.
- Alam, S.; Brailsford, S. R.; Whiley, R. A. & Beighton, D. (1999) PCR-based methods for genotyping viridians group streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 37: 2772-2776.
- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. (2000) BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 272p.
- Camper, A. K.; McFeters, G. A.; Characklis, W. G. & Jones, W. L. (1991) Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2233-2239.
- Chalmers, R. M.; Aird, H. & Bolton, F. J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 124S-132S.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4555-4558.
- Dombek, P. E.; Johnson, L. K.; Zimmerley, S. T. & Sadowsky, M. J. (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2572-2577.
- Duriez, P.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E.; Chaventré, A.; Elion, J.; Picard, B. & Denamur, E. (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetic distributed among geographically distinct human population. **Microbiol.** 147: 1671-1676.
- Feldman, K. A.; Mohle-Boetani, J. C.; Ward, J.; Furst, K.; Abbott, S. L.; Ferrero, D. V.; Olsen, A. & Werner, S. B. (2002) A cluster of *Echerichia coli* O157:Nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. **Public Health Rep.** 117: 380-385.
- Geldreich, E. E. & Kenner, B. A. (1969) Concepts of faecal streptococci in stream pollution. **J. War. Pollut. Control. Fed.** 41: R336-R352.
- Herzer, P. J.; Inouye, S.; Inouye, M. & Whittan, T.S. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 172: 6175-6181.
- Hoffmann, H.; Hornef, M. W.; Schubert, Soren & Roggenkamp (2001) Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** 291:227-230.
- Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.** 139: 155-162.
- Johnson, J. R. & Stell, A. L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181: 261-272.

- Johnson, J. R.; Delavari, P.; Kuskowski, M. & Stell, A. L. (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 183: 78-88.
- Lee, S. H.; Levy, D. A.; Craun, G. F.; Beach, M. J. & Calderon, R. L. (2002) Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1999-2000. **MMWR Surveill. Summ.** 51: 1-47.
- Licence, K.; Oates, K. R.; Synge, B. A. & Reid, T. M. S. (2001) an outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiol. Infect.** 126:135-138.
- Maas, R. (1983) An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. **Plasmid** 10: 296-298.
- Mehta, Y. R.; Mehta, A. & Rosato, Y. B. (2002) ERIC and REP-PCR banding patterns and séquence análisis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. **Curr. Microbiol.** 44: 323-328.
- Moura, A. C.; Irino, K. & Vidotto, M. C. (2001) Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic polymerase chain reaction. **Avian Dis.** 45: 173-181.
- Orskov, F. (1981) *Escherichia coli*. in M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Truper; A. Balows & H. G. Shlegel (eds.) The Prokaryotes: A Handbook on habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Springer-Verlag. pp 1128-1134.
- Parry, S. M. & Palmer, S. R. (2000) The public health significance of VTEC O157. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 1S-9S.
- Parveen, S.; Portier, K. M.; Robinson, K.; Edmiston, L. & Tamplin, M. I. (1999) Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3142-3147.
- Picard, B.; Garcia, J. S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen. E.; Elion, J. & Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67: 546-553.
- Pupo, G. M.; Karaolis, D. K. R.; Lan, R. & Reeves, P. R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infect. Immun.** 65: 2685-2692.
- Samadpour, M.; Stewart, J.; Steingart, K.; Addy, C.; Louderback, J.; McGinn, M.; Ellington, J. & Newman, T. (2002) Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in battle Ground Lake, Vancouver, Washington. **J. Environ. Health.** 64: 16-20.
- Selander, R. K.; Caugant, D. A.; Ochman, H.; Musser, M.; Gilmour, M. N. & Whittam, T. S. (1986) Methods of multilocus enzyme eletrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 873-884.

- Sibille, I.; Sime-Ngando, T.; Mathieu, L. & Block, J. C. (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 197-202.
- Swerdlow, D. L.; Woodruff, B. A.; Brady, R. C.; Griffing, P. M.; Tippen, S.; Donnell Jr., H. D.; Geldreich, E.; Payne, B. J.; Meyer Jr., A.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Bright, M.; Bean, N. H. & Blake, P. A. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Ann. Intern. Med.** 117: 812-819.
- Teanpaisan, R. & Douglas, C. W. I. (1999) Molecular fingerprint of *Porphyromonas gingivalis* by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprint methods. **J. Med. Microbiol.** 48: 741-749.
- Turner, S. J.; Lewis, G. D. & Bellamy, A. R. (1997) A genomic polymorphism located downstream of the *gcvP* gene of *Escherichia coli* that correlates with ecological niche. **Mol. Ecol.** 6: 1019-1032.
- Vinuesa, P.; Rademaker, J. L. W.; de Bruijn, F. J. & Werner, D. (1998) Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprint, and Partial 16S rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2096-2104.
- World Health Organization (1996) Guidelines for drinking water quality – Health criteria and other supporting information. Vol. 2. Second ed. WHO. Geneva.
- Yarze, J. C. & Chase, M. P. (2000) *E. coli* O157:H7 – Another waterborne outbreak! **Am. J. Gastroenterol.** 95: 1096.
- Yatsuyanagi, J. Saito, S. & Ito, I. (2002) A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Jpn. J. Infect. Dis.** 55:174-176.

CONCLUSÕES

1. As técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR mostraram-se eficientes na diferenciação das linhagens de *E. coli* isoladas nas represas Billings e Guarapiranga e em águas destinadas ao consumo humano, evidenciando uma grande variabilidade genética entre as linhagens analisadas e a existência de diversos eventos de contaminação das águas das represas e destinadas ao consumo humano.
2. Observou-se indícios de que a seleção de linhagens e/ou o grau de similaridade das linhagens contaminantes são semelhantes nas represas Billings e Guarapiranga, no período de amostragem analisado.
3. O procedimento de aleatorização mostrou indícios de que as linhagens isoladas de uma mesma represa são mais semelhantes entre si do que com linhagens isoladas da outra represa.
4. As técnicas de BOX-, REP- e ERIC-PCR analisadas conjuntamente agruparam, de uma maneira geral, linhagens de *E. coli* pertencentes aos mesmos grupos filogenéticos.
5. As porcentagens de linhagens pertencentes ao grupo filogenético B2 sugerem que a origem da contaminação na represa Billings é principalmente humana (7,69%), enquanto que na represa Guarapiranga é animal (4,41%).
6. Três linhagens na represa Billings e 8 na represa Guarapiranga apresentaram resultado positivo quando hibridadas com as sondas para fatores de virulência intestinais. Seis destas linhagens apresentaram o plasmídio de aderência de EAEC, 2 apresentaram o gene codificador da intimina de EPEC, 2 o gene para a enterotoxina termo-lábil I de ETEC e 1 o gene para a toxina Shiga-like II, de VTEC.
7. As linhagens isoladas nos rios Jaguari e Sorocaba não apresentaram diferenças entre si com relação à distribuição em grupos filogenéticos.

8. A baixa porcentagem de linhagens do grupo B2 indica que a contaminação por *E. coli* nos rios é, principalmente, de origem animal.
9. Os diferentes tipos de água bruta analisados (poço, nascente e mineral) apresentaram composição de grupos filogenéticos diferentes.
10. Das 19 linhagens isoladas de água de consumo analisadas através da técnica de hibridação de colônias, nenhuma apresentou resultado positivo com as sondas testadas neste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- Ackman, D.; Marks, S.; Mack, P., Caldwell, M.; Root, T. & Birkhead G. (1997) Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of fresh water lake. **Epidemiol. Infect.** 119: 1-8.
- Agard, L.; Alexander, C.; Green, S.; Jackson, M.; Patel, S. & Desiyun, A. (2002) Microbial quality of water supply to an urban community in Trinidad. **J. Food Prot.** 65: 1297-1303.
- Alam, S.; Brailsford, S. R.; Whiley, R. A. & Beighton, D. (1999) PCR-based methods for genotyping viridians group streptococci. **J. Clin. Microbiol.** 37: 2772-2776.
- Badge, U. S. & Rangari, A. K. (1999) Periodicity of coliform bacteria in an aquatic environment. **Wat. Sci. Tech.** 40: 151-157.
- Baldy-Chudzik, K.; Niedbach, J. & Stosik, M (2001) Application of rep-PCR fingerprinting for genotyping of *Escherichia coli* strains in Wojnowskie Wschodnie and Wojnowskie Zachodnie lake. **Acta Microbiol. Pol.** 50:233-242.
- Barker, J. H.; Musher, D. M.; Silberman, R.; Phan, H. M. & Watson, D. A. (1999) Genetic relatedness among nontypeable Pneumococci implicated in sporadic cases of conjunctivitis. **J. Clin. Microbiol.** 37: 4039-4041.
- Besser, T. E.; Hancock, D. D.; Pritchett, L. C.; McRae, E. M.; Rice, D. H. & Tarr, P. I. (1997) Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **J. Infect. Dis.** 157: 726-729.
- Bingen, E.; Picard, B.; Brahimi, N.; Mathy, S.; Desjardins, P.; Elion, J. & Denamur, E. (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J. Infect. Dis.** 177: 642-650.
- Blanco, M.; Blanco, J. E.; Gonzalez, E. A.; Mora, A.; Jansen, W.; Gomes, T. A. T.; Zerbini, L. F.; Yano, T.; Castro, A. F. P. & Blanco J. (1997) Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2958-2963.
- Blattner, F. R.; Plunkett III, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. B.; Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science** 277: 1453- 1462.
- Bonacorsi, S. P. P.; Clermont, O.; Tinsley, C.; Le Gall, I.; Beaudoin, J.C.; Elion, J.; Nassif, X. & Bingen, E. (2000) Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infect. Immun.** 68: 2096-2101.
- Boyd, E. F. & Hartl, D. L. (1998) Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **J. Bacteriol.** 180: 1159-1165.

- Brenner, D. J. & Falkow, S. (1971) Molecular relationships among members of the *Enterobacteriaceae*. **Adv. Genet.** 16: 81-118.
- Brenner, D. J. (1981) Introduction to the family *Enterobacteriaceae*. Pages 1105-1127 in M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Truper; A. Balows & H. G. Shlegel eds. *The Prokaryotes: A Handbook on habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Vol 2, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Brenner, D. J. (1983) Impact of modern taxonomy on clinical microbiology. **ASM News** 49: 58-63.
- Chalmers, R. M.; Aird, H. & Bolton, F. J. (2000) Waterborne *Escherichia coli* O157. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.** 88: 124S-132S.
- Cieslak, P. R.; Barrett, T. J.; Griffin, P. M.; Gensheimer, K. F.; Beckett, G.; Buffington, J. & Smith, M. G. (1993) *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. **The Lancet** 342: 367.
- Claridge III, J. E.; Osting, C.; Jalali, M.; Osborne, J. & Waddington, M. (1999) Genotypic and phenotypic characterization of "*Streptococcus milleri*" group isolates from a veterans administration hospital population. **J. Clin. Microbiol.** 37: 3681-3687.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4555-4558.
- Dombek, P. E.; Johnson, L. K.; Zimmerley, S. T. & Sadowsky, M. J. (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2572-2577.
- Edberg, S. C.; Rice, E. W.; Karlin, J. W. & Allen, M. J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **J. Appl. Microbiol.** 88: 106S-116S.
- Elias, W. P.; Suzart, S.; Trabulsi, L. R.; Nataro, J. P. & Gomes, T. A T. (1999) Distribution of *aggA* and *aafA* gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. **J. Med. Microbiol.** 48: 597-599.
- Espinosa-Urgel, M & Kolter, R. (1998) *Escherichia coli* genes expressed preferentially in an aquatic environment. **Mol. Microbiol.** 28: 325-332.
- Feldman, K. A.; Mohle-Boetani, J. C.; Ward, J.; Furst, K.; Abbott, S. L.; Ferrero, D. V.; Olsen, A. & Werner, S. B. (2002) A cluster of *Escherichia coli* O157:Nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. **Public Health Rep.** 117: 380-385.
- Fransolet, G.; Villers, G. & Masschelein, W. J. (1985) Influence of temperature on bacterial development in waters. **Ozone Sci.** 7: 205-227.
- Freedman, D. J.; Tacket, C.O.; Delehanty, A.; Maneval, D. R.; Nataro, J. & Crabb, J. H. (1998) Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 177: 662-667.

- Garcia-Rodriguez, J. A. (1998) Bacteriological comparison of cefixime in patients with noncomplicated urinary tract infection in Spain. **Chemotherapy** 44(1): 28-30.
- Gilligan, P. H. (1999) *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clin. Lab. Med.** 19: 505-521.
- Gioppo, N. M. R.; Elias Jr., W. P.; Vidotto, M. C.; Linhares, R. E.; Saridakis, H. O.; Gomes, T. A. T.; Trabulsi, L. R. & Pelayo, J. S. (2000) Prevalence of Hep-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.** 190: 293-298.
- Gomes, T. A. T.; Vieira, M. A. M.; Abe, C. M.; Rodrigues, D.; Griffin, P., M. & Ramos, S. R. T. S. (1998) Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3609-3613.
- Gonçalves, A. G.; Campos, L. C.; Gomes, T. A. T.; Rodrigues, J.; Sperandio, V.; Whittam, T. S. & Trabulsi, L. R. (1997) Virulence properties and clonal structure of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.** 65: 2034-2040.
- González, R.; Díaz, C.; Mariño, M.; Cloralt, R.; Pequenez, M. & Pérez-Schael, I. (1997) Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1103-1107.
- Goullet, Ph & Picard, B. (1986) Comparative esterase electrophoretic polymorphism of *Escherichia coli* isolates obtained from animal and human sources. **J. Gen. Microbiol.** 132: 1843-1851.
- Hartl, D. L. & Dykhuizen, D. E. (1984) The population genetics of *Escherichia coli*. **Ann. Rev. Genet.** 18: 31-68.
- Henry, D.; Ellison, W.; Sullivan, J.; Mansfield, D. L.; Magner, D. J.; Dorr, M. B. & Talbot, G. H. (1998) Treatment of community-acquired acute uncomplicated urinary tract infection with sparfloxacin versus ofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 2262-2266.
- Herzer, P. J.; Inouye, S.; Inouye, M. & Whittam, T.S. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 172: 6175-6181.
- Hoffmann, H.; Hornef, M. W.; Schubert, Soren & Roggenkamp (2001) Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** 291:227-230.
- Huang, B.; Subramaniam, S.; Chua, K.; Kwang, J.; Loh, H.; Frey, J. & Tan, H. (1999) Molecular fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* by repetitive sequence PCR. **Veterinary Microbiology** 67:213-219.
- Hulton, C. S.; Higgins, C. F. & Sharp, P. M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol. Microbiol.** 5: 825-834.

- Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.** 139: 155-162.
- Johnson, J. R. & Stell, A. L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise **J. Infect. Dis.** 181: 261-272.
- Kemp, A. L. W. & Mudrochova, A. (1973) The distribution and nature of amino acids and other nitrogen-containing compounds in Lake Ontario surface sediments. **Geochim. Cosmochim. Acta** 37: 2191-2206.
- Kuhnert, P.; Boerlin, P. & Frey, J. (2000) Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 107-117.
- LeChevallier, M. W.; Welch, N. J. & Smith, D. B. (1996) Full-scale study of factors related to coliform regrowth in drinking water. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2201-2211.
- Licence, K.; Oates, K. R.; Synge, B. A. & Reid, T. M. S. (2001) an outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiol. Infect.** 126:135-138.
- Maas, R. (1983) An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. **Plasmid** 10: 296-298.
- Martin, B.; Humbert, O.; Camara, M.; Guenzi, E.; Walker, J.; Mitchell, T.; Andrew, P.; Prudhomme, M.; Alloing, G.; Hakenbeck, R.; Morrison, D. A.; Boulnois, G. J. & Claverys, J. P. (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.** 20: 3479-3483.
- Mason, T. G. & Richardson, G. (1981) A review: *Escherichia coli* and the human gut: some ecological considerations. **J. Appl. Bacteriol.** 1: 1-16.
- McCarthy, T. A.; Barrett, N. L.; Hadler, J. L.; Salsbury, B.; Howard, R. T.; Dingman, D. W.; Brinkman, C. D.; Bibb, W. F. & Carter, M. L. (2001) Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. **Pediatrics** 108: E59.
- Mehta, Y. R.; Mehta, A. & Rosato, Y. B. (2002) ERIC and REP-PCR banding patterns and séquence análisis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. **Curr. Microbiol.** 44: 323-328.
- Mereghetti, L.; Tayoro, J.; Watt, S.; Lanotte, P.; Loulergue, J.; Perrotin, D. & Quentin, R. (2002) Genetic relationship between *Escherichia coli* strains isolated from the intestinal flora and those responsible for infectious diseases among patients hospitalized in intensive care units. **J. Hosp. Infect.** 52: 43-51.
- Monteiro-Neto, V.; Campos, L. C.; Ferreira, A. J. P.; Gomes, T. A. T. & Trabulsi, L. R. (1997) Virulence properties of *Escherichia coli* O111:H12 strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 146: 123-128.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-201.

- Nixon, S. R. & Mawer, G. E. (1970) The digestion and absorption of protein in man. 2. The form in which digested protein is absorbed. **Br. J. Nutr.** 24: 241-158.
- Ohno, A.; Marui, A.; Castro, E. S.; Reyes, A. A. B.; Elio-Calvo, D.; Kasitani, H.; Ishii, Y. & Yamaguchi, K. (1997) Enteropathogenic bacteria in the La Paz river of Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 57: 438-444.
- Orskov, F. (1981) *Escherichia coli*. in M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Truper; A. Balows & H. G. Shlegel (eds.) The Prokaryotes: A Handbook on habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Springer-Verlag. pp 1128-1134.
- Paunio, M.; Pebody, R.; Keskimäki, M.; Kokki, M.; Ruutu, P.; Oininen, S.; Vuotari, V.; Siitonen, A.; Lahti, E. & Leinikki, P. (1999) Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. **Epidem. Infect.** 122: 1-5.
- Picard, B.; Garcia, J. S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen, E.; Elion, J. & Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67: 546-553.
- Pooler, M. R.; Ritchie, D. F. & Hartung, J. S. (1996) Genetics relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3121-3127.
- Pupo, G. M.; Karaolis, D. K. R.; Lan, R. & Reeves, P. R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infect. Immun.** 65: 2685-2692.
- Rogerie, F.; Marecat, A.; Gambade, S.; Dupond, F.; Beaubois, P. & Lange, M. (2001) Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O 157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. **Int. J. Food Microbiol.** 63: 217-223.
- Rosa, A. C. P.; Mariano, A. T.; Pereira, A. M. S.; Tibana, A.; Gomes, T. A. T. & Andrade, J. R. C. (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.** 47: 781-790.
- Sadowsky, M. J.; Kinkel, L. L.; Bowers, J. H. & Schottel, J. L. (1996) Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3489-3493.
- Samadpour, M.; Stewart, J.; Steingart, K.; Addy, C.; Louderback, J.; McGinn, M.; Ellington, J. & Newman, T. (2002) Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in battle Ground Lake, Vancouver, Washington. **J. Environ. Health.** 64: 16-20.
- Savageau, M. A (1977) Design of molecular control mechanisms and the demand for gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74: 5647-5651.
- Savageau, M. A. (1983) *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. **Am. Nat.** 122: 732-744.

- Saylers, A. A. & Whitt, D. D. (1994) Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach. ASM Press. pp 190-204.
- Selander, R. K.; Caugant, D. A.; Ochman, H.; Musser, M.; Gilmour, M. N. & Whittam, T. S. (1986) Methods of multilocus enzyme eletrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 873-884.
- Sharples, G.J.; Lloyd, R.G. (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Res.** 18: 6503-6508.
- Shere, J. A.; Bartlett, K. J. & Kaspar, C. W. (1998) Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Winsconsin. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1390-1399.
- Solo-Gabriele, H. M.; Wolfert, M. A.; Desmarais, T. R. & Palmer C. J. (2000) Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 230-237.
- Stern, M. J.; Ames, G. F.; Smith, N. H.; Robinson, E. C.; & Higgins, C. F. (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell** 37: 1015-1026.
- Swerdlow, D. L.; Woodruff, B. A.; Brady, R. C.; Griffing, P. M.; Tippen, S.; Donnell Jr., H. D.; Geldreich, E.; Payne, B. J.; Meyer Jr., A.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Bright, M.; Bean, N. H. & Blake, P. A. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Ann. Intern. Med.** 117: 812-819.
- Tarr, P. I. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. **Clin. Infect. Dis.** 20: 1-10.
- U.S. Department of Health and Human Services (1995) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 44: 157-159.
- Valle, G. R. F.; Gomes, T. A. T.; Irino, K. & Trabulsi, L. R. (1997) The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 152: 95-100.
- van Belkum, A.; Sherer, S. Van Alphen, L. & Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 275-293.
- van Belkum, A.; Struelens, M.; de Visser, A.; Verbrugh, H. & Tibayrenc, M. (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 547-560.
- Ventura, M & Zink, R. (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiol. Lett.** 217: 141-54
- Vinuesa, P.; Rademaker, J. L.; deBruijn, F. J. & Werner, D. (1998) Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of gene

encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2096-2104.

Wang, G. & Doyle, M. P. (1998) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **J. of Food Protection** 61: 662-667.

Warner, M.; Kuo, K.; Williams, L.; Adam, B.; Langkop, C.; Ruden, R.; Francis, B. & Haupt, T. (1996) Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7: Illinois. **Mor. Mortal. Wkly. Rep.** 45: 437-439.

Wetzel, R. G., (1975) *Limnology*. Saunders, Philadelphia.

World Health Organization (1995) Integrated management of the sick child. **Bull. World Health Organ.** 73: 735-740.

World Health Organization (1996) Guidelines for drinking water quality – Health criteria and other supporting information. Vol. 2. Second ed. WHO. Geneva.

Yamashiro, T.; Nakasone, N.; Higa, N.; Iwanaga, M.; Insisiengmay, S.; Phounane, T.; Munnalath, K.; Sithivong, N.; Sisavath, L.; Phanthauamath, B.; Chomlasaki, K.; Sisulath, P. & Vongsanith, P. (1998) Etiological study of diarrheal patients in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. **J. Clin. Microbiol.** 36: 2195-2199.

Yarze, J. C. & Chase, M. P. (2000) *E. coli* O157:H7 – Another waterborne outbreak! **Am. J. Gastroenterol.** 95: 1096.

Yatsuyanagi, J. Saito, S. & Ito, I. (2002) A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Jpn. J. Infect. Dis.** 55:174-176.