



CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS À EPEC E STEC EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUA (ETAs)

Paulo Alfonso Schuroff¹; Nicole Ribeiro de Lima²; Tatiane das Neves Burgos³; Jacinta Sanchez Pelayo⁴

RESUMO: As ETAs são projetadas com a função de captar água, tratar e a distribuir na forma potável. Neste processo, são originados resíduos como lodo de decantador e água de lavagem de filtros. Dentre os diversos tipos de bactérias encontradas nos resíduos, destacamos a *E. coli*. Embora comensal, algumas cepas dessa espécie podem causar gastroenterites, representando assim um dos principais agentes causais de diarreia em crianças e em adultos nos países em desenvolvimento. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar genotípicamente 171 cepas de *E. coli* isoladas de água bruta e resíduos (lodo e água de lavagem de filtros) de duas ETAs (Cafezal e Tibagi) da cidade de Londrina, PR. Estas cepas foram investigadas para a presença dos marcadores de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfp* e *hlyA* pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Cinco isolados (2,9%) foram positivos para o gene *eae* sendo classificados como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) atípica. Oito cepas (4,7%) foram classificadas como *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) sendo que destas, sete foram positivas para a sequência *stx1* e uma positiva para as sequências *stx1*, *stx2* e *hlyA*. Nenhum isolado foi positivo para o gene *bfp*. Portanto a partir dos resultados encontrados esperamos conscientizar tanto a população como os órgãos públicos da importância do controle microbiológico dos resíduos de ETAs na prevenção de surtos e infecções relacionados aos corpos d'água que recebem esses resíduos.

PALAVRAS-CHAVE: EPEC; Estações de Tratamento de Água; STEC.

1 INTRODUÇÃO

As ETAs captam água disponível superficialmente dos rios, lagos e reservatórios, realizam o tratamento e a distribuem sob a forma de água potável de acordo com a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). As impurezas contidas na água são removidas durante o processo de potabilização juntamente com os produtos químicos utilizados no tratamento, originando assim, como resíduos principais, os lodos de decantadores e a água de lavagem dos filtros (PAIXÃO et al., 2008).

Os lodos gerados nos decantadores das ETAs podem ter suas características bastante variadas, dependendo fundamentalmente das condições apresentadas pela água bruta, dosagens e produtos químicos utilizados, forma de limpeza dos decantadores, entre outros fatores e são potencialmente tóxicos para plantas, seres humanos e organismos aquático. O descarte do lodo de ETA em rios pode alterar consideravelmente

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. pauloalfonso@hotmail.com

² Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná nicoleriblima@hotmail.com

³ Doutoranda do departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina tatianeburgos@hotmail.com

⁴ Orientadora, Professora Doutora do Centro de Ciências Biológicas – UEL. jspelayo@gmail.com

as características da água do corpo receptor, provocando o assoreamento e mudança na cor, turbidez e composição química, além da possibilidade de contaminação do lençol freático (REIS et al., 2007).

Além do lodo do decantador outra forma de gerar resíduos encontrados nas ETAs é através da lavagem dos filtros. Os filtros são normalmente lavados através do fluxo de água limpa no sentido contrário à filtração. A vazão utilizada deve ser suficiente para expandir o leito filtrante e liberar o material sólido retido na camada filtrante, por isso é necessária a utilização de uma vazão bem acima da vazão de operação da estação, levando à produção de grande volume de água residuária e baixas concentrações de sólidos, num curto espaço de tempo. Na prática, a água de lavagem de filtros tem sido comumente lançada em rios ou rede de esgoto ou ainda, recirculada na própria estação (USEPA, 2000).

A avaliação de presença de microrganismos indicadores fecais, realizadas frequentemente, é o modo mais sensível e específico de avaliar a qualidade sanitária da água bem como os parâmetros microbiológicos de efluentes. Indicadores microbiológicos têm sido utilizados mundialmente para verificar a contaminação por resíduos humanos e animais. Tipicamente são utilizados organismos encontrados em elevadas concentrações no intestino e fezes de seres humanos, mamíferos de sangue quente, inclusive os de vida selvagem. Os indicadores geralmente utilizados incluem coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus spp.* sendo a *E. coli* de grande importância clínica, por se tratar de um dos principais agentes causais de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli associada à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e os grupos classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) típica e atípica e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), na qual a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) constitui uma subcategoria de STEC, são importantes agentes causais de diarreia, principalmente nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998).

Considerando a importância das diarreias causadas por *E. coli* em nosso meio, vimos a necessidade de um estudo avaliando a presença genotípica de fatores de virulência associados à diarreia em amostras de *E. coli* diarreio gênicas (EPEC e STEC) isoladas de água bruta e resíduos (lodo e água de lavagem de filtros) de Estações de Tratamento de Água (Cafezal e Tibagi) da cidade de Londrina, PR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este trabalho 171 cepas de *E. coli* isoladas de água bruta e resíduos (lodo e água de lavagem de filtros) de duas ETAs (Cafezal e Tibagi) da cidade de Londrina, PR.

A Tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados e temperatura de anelamento. Os genes *eae* e *bfp* foram pesquisados para caracterizar o patótipo de EPEC típica; *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* o de STEC e as que só apresentarem o gene *eae* foram caracterizadas como EPEC atípica. As reações de amplificação foram realizadas da seguinte maneira: culturas em ágar Luria-Bertani foram suspensas em 300 µL de água Milli-Q e fervidas por 10 minutos para liberação e desnaturação do DNA bacteriano (ALBRIGHT; HUALA; AUSUBEL, 1989). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em volumes de 25 µL, contendo 2 µL do lisado bacteriano, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador e 1.5 U Taq DNA polimerase. Depois de amplificado, o produto de amplificação foi submetido à

eletroforese em gel de agarose de 1% a 2%, dependendo do tamanho do fragmento amplificado, corado com SYBR Safe e visualizado usando luz UV. Bactérias padrões descritas na literatura as quais apresentam os genes pesquisados foram utilizadas como controles positivo e a cepa HB101 (*E. coli* K-12) como controle negativo.

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

Gene	Sequência do oligonucleotídeo (5' → 3')	Fragmento (pb)	Anelamento	Referência
<i>bfpA</i>	(F) CAATGGTGCTTGCCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT	326	60°C	Gunzburg; Torniepoth; Riley, 1995
<i>Eae</i>	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	60°C	Paton; Paton 1998
<i>Stx1</i>	(F) ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC (R) AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	60°C	Paton; Paton 1998
<i>Stx2</i>	(F) GGCACGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	60°C	Paton; Paton 1998
<i>hlyA</i>	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC (R) AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	60°C	Paton; Paton 1998

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 171 cepas isoladas, cinco (2,9%) foram positivas para o gene *eae* sendo classificadas como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) atípica. Oito cepas (4,7%) foram classificadas como *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) sendo que destas, sete foram positivas para a sequência *stx1* e uma positiva para as sequências *stx1*, *stx2* e *hlyA*. Nenhum isolado foi positivo para o gene *bfp*. Neste estudo, a detecção de marcadores de virulência específicos permitiu classificar oito cepas como STEC (*stx* positiva) e cinco como EPEC atípica (*eae* positiva).

Diversos estudos correlacionam a presença do gene *stx* em linhagens de *E. coli* com severas doenças em humanos (CAPRIOLI *et al.*, 2005). *E. coli* que possuem o perfil *eae+*/ *EAF-*/ *stx-* têm sido correlacionadas com diarreia. Além disso, cepas de EPEC atípica possuem um perfil genômico característico que possibilita a aquisição de fatores de virulência típicos de outras linhagens de *E. coli* patogênicas (BANDO *et al.*, 2009).

4 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos concluímos que apesar da prevalência de STEC e EPEC nos resíduos de ETAs serem baixas, ainda podem representar um risco para a população devido sua alta virulência, principalmente quando tais resíduos não são tratados adequadamente.

REFERÊNCIAS

ALBRIGHT, L.M., HUALA, E., AUSUBEL, F.M. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. **Annual Review of Genetics**, v. 23, p. 311–336, 1989.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, p. 22-30, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 2914 de 12 de Dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**. v. 36, p. 289-311, 2005.

GUNZBURG, S. T., TORNIEPORTH, N. G., RILEY, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1375–1377, 1995.

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

PAIXÃO, L. C. C.; YOSHIMURA, H. N.; ESPINOSA, D. C. R.; TENORIO, J. A. S. Efeito da incorporação de lodo de ETA contendo alto teor de ferro em cerâmica argilosa. **Revista Cerâmica**, v.54, p.63-76, 2008.

Paton, A. W.; J. C. Paton. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology** v. 36, p. 598–602, 1998.

REIS, E. L.; COTRIM, M. E. B.; RODRIGUES, C.; PIRES, M. A. F.; BELTRAME FILHO, O.; ROCHA, S. M.; CUTOLO, S. A. Identificação da influência do descarte de lodo de estações de tratamento de água. **Revista Química Nova**, v. 30, p.865-872, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). National primary drinking water regulations. Filter backwash recycling rule. **Final rule**. Washington, D.C. 2000.