

Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia Coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano

Genotypic characterization of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia Coli isolated from water for human consumption

Silvia Emanoele Cestari¹, Paulo Alfonso Schuroff¹, Nicole Ribeiro de Lima¹, Tatiane das Neves Burgos¹, Angélica Marim Lopes Dambrozio¹, Jacinta Sanchez Pelayo^{2*}

¹Mestre em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina; ²Doutora em Ciências Biológicas – Microbiologia. Universidade de São Paulo. Professor Associado da Universidade Estadual de Londrina

Resumo

Introdução: As doenças veiculadas pela água são principalmente causadas por patógenos entéricos, sendo o patótipo *Escherichia coli* enterotoxigênica (EPEC) de grande importância em países em desenvolvimento. **Objetivo:** Detectar a presença de genes de virulência relacionados à EPEC em cepas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano. **Metodologia:** 295 cepas de *E. coli* obtidas de água de 27 municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil, entre fevereiro e dezembro de 2005, foram testadas quanto a presença de genes que codificam para as enterotoxinas LT-I (*lt-I*), ST-a (*st-a*) e ST-b (*st-b*) e para os fatores de colonização CFA/I (*cfa/I*), CFA/II (*cfa/II*), K88 (*faeG*) e K99 (*fanC*) através da técnica da PCR. **Resultados:** Das 295 cepas de *E. coli* estudadas, 36 (12,2%) apresentaram o gene *lt-I*, uma (0,34%) o gene *st-a* e três (1,02%) o *st-b*. Quanto aos fatores de colonização, três cepas (1,02%) foram positivas para o gene *faeG*, quatro (1,36%) para *cfa/I*, duas (0,68%) para *cfa/II* e nenhuma apresentou o gene *fanC*. Uma cepa (0,34%) foi positiva simultaneamente para os genes *lt-I* e *st-b* e outra (0,34%) para os genes *lt-I* e *faeG*. **Conclusão:** Logo, cinquenta e uma (17,29%) cepas apresentaram, pelo menos, um gene que codifica enterotoxina e/ou fator de colonização relacionado à EPEC. Sendo assim, o cuidado com a qualidade microbiológica da água para consumo humano é fundamental, evitando que a mesma torne-se veículo de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas, como EPEC.

Palavras-chave: EPEC. Água Potável. Fatores de Virulência.

Abstract

Introduction: The waterborne diseases are mainly caused by enteric pathogens, being the pathotype enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) of great importance in developing countries. **Objective:** This study aimed to detect the presence of virulence genes related to EPEC in *E. coli* strains isolated from drinking water. **Methodology:** A total of 295 strains of *E. coli* were isolated from water of 27 municipalities in the north of Paraná State – Brazil, between February and December 2005. Strains were tested for the presence of genes coding to LT-I (*lt-I*), ST-a (*st-a*) and ST-b (*st-b*) enterotoxins, and CFA/I (*cfa/I*), CFA/II (*cfa/II*), K88 (*faeG*) and K99 (*fanC*) colonization factors, using the PCR technique. **Results:** Of the 295 strains of *E. coli* studied, 36 (12.2%) had the *lt-I* gene, one strain (0.34%) *st-a* gene and three (1.02%) *st-b*. As for colonization factors, three strains (1.02%) were positive to *faeG* gene, four (1.36%) to *cfa/I*, two (0.68%) to *cfa/II* and no strain was positive to *fanC* gene. One strain (0.34%) was positive for both *lt-I* e *st-b* genes and one (0.34%) for *lt-I* e *faeG* genes. **Conclusion:** Therefore, fifty-one (17.29 %) strains showed at least a gene encoding enterotoxina and / or colonization factor related to EPEC . Therefore, it is essential to monitor the microbiological quality of drinking water, avoiding it to become a vehicle for the transmission of potentially pathogenic bacteria such as EPEC.

Keywords: EPEC. Drinking Water. Virulence Factors.

INTRODUÇÃO

A água é o mais importante recurso natural do mundo e sem ela a vida não pode existir, pois nenhum processo metabólico ocorre sem a sua ação direta ou indireta. As doenças veiculadas pela água são principalmente causadas por patógenos entéricos, sendo *Escherichia coli* de grande importância clínica, por se tratar de uma bactéria termotolerante de origem exclusivamente fecal (CABRAL,

2010). Dados epidemiológicos mostram que cerca de 700.000 mil pessoas de países em desenvolvimento morrem todos os anos por decorrência da diarreia por EPEC (MENEZES et al., 2003). *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e estão agrupadas em oito patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012).

Correspondente/ Corresponding: *Jacinta Sanchez Pelayo – Endereço: Departamento de Microbiologia/Laboratório de Bacteriologia/CCB / UEL – Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380 CX: 6001 – CEP: 86051-990. Londrina, PR – Tel: (43) 3371-4494 – E-mail: jspelayo@gmail.com

ETEC são *E. coli* que produzem a toxina termoestável (ST) e/ou toxina termolábil (LT) (FENG; WEAGANT; JINNE-MAN, 2011). A infecção por cepas de ETEC é responsável por casos de diarreia em crianças e viajantes. Diarreia por ETEC pode ser o resultado da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes humanas e de animais. A doença se manifesta através de uma diarreia podendo ainda estar associada em alguns casos com uma febre baixa. (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2011; FORSYTHE, 2013).

O desenvolvimento de diarreia por ETEC depende de dois fatores importantes: colonização do intestino delgado e produção de enterotoxinas (CROXEN; FINLAY, 2010). As enterotoxinas LT e ST causam perda de água e eletrólitos para dentro do lúmen intestinal provocando diarreia e desidratação (ISIDEAN et al., 2011).

LTs são toxinas oligoméricas, e atuam aumentando os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) aumento da secreção de íons cloreto e carbonato, de água e na inibição da absorção de sódio. Existem dois grandes grupos de LT: LT-I e LT-II. LTI pode ser subdividida em LTIh, toxina prevalente em ETEC isoladas de seres humanos e LTIp, toxina prevalente de ETEC oriunda de suínos e seres humanos (MAINIL, 2013). STs são toxinas monoméricas termoestáveis e são divididas em duas grandes classes: ST-a (ST-I) e ST-b (ST-II).

No processo de patogenicidade, primeiramente ETEC necessita se aderir ao epitélio intestinal para não ser eliminada com o peristaltismo, depois de adesão ETEC inicia a produção da enterotoxina STa. Nas microvilosidades intestinais está presente o receptor de STa o guanilato ciclase C (GC-C). Quando a toxina se liga ao seu receptor causa um aumento intracelular de monofosfato guanilato cíclico (cGMP), além da ativação da proteína quinase II cGMP-dependente (cGKII). Essa quinase fosforila e ativa o canal de cloreto (CFTR), o que resulta na secreção de íons cloreto e bicarbonato e na inibição da absorção de íons sódio e efluxo de água para o lúmen intestinal (FOSTER; SMITH, 2009).

A colonização do intestino delgado é outro fator importante para o aparecimento da diarreia. A adesão de ETEC no intestino delgado ocorre por fatores de colonização, fimbriais ou não fimbriais. As cepas enterotoxigênicas, além da capacidade de produzirem toxinas, precisam aderir-se à mucosa do intestino delgado e colonizá-lo para que o processo infeccioso se estabeleça. Esta adesão é mediada por fimbrias protéicas, que são conhecidas como fatores de colonização presentes na superfície bacteriana e que reconhecem receptores específicos, localizados na superfície da célula epitelial intestinal (MADHAVAN; SAKELLARIS, 2015). No patotipo ETEC são conhecidos vários fatores de colonização como: K88 (F4), K99 (F5), 987P e F41 isolados de cepas de ETEC de animais (suínos, bovinos e ovinos) (ZHOU; ZHU; ZHU, 2012) e os fatores de colonização (CFAs) descritos em cepas enterotoxigênicas isoladas de humanos. Pelo menos 20 diferentes tipos de CFAs são conhecidos em infecções por ETEC em humanos e os melhores caracterizados são: CFA/I, CFA/II e CFA/IV (MADHAVAN; SAKELLARIS, 2015).

Cepas de ETEC podem ser identificadas pela detecção de genes responsáveis pela produção de tais toxinas e fatores de colonização, utilizando técnicas de hibridização de DNA ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MAINIL, 2013). Observada a importância da diarreia associada à água contaminada em nosso meio, considerou-se importante a realização de um estudo para avaliar a presença de marcadores de virulência associados à ETEC em cepas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano na região norte do Paraná.

METODOLOGIA

Amostragem

O estudo foi realizado com 295 amostras de água destinadas ao consumo humano coletadas pela vigilância sanitária no ano de 2005, a amostragem foi estabelecida por esta agência. Dezoito (6,10%) amostras foram obtidas de água tratada e 277 (93,90%) de água *in natura*. As 18 amostras de água tratada foram coletadas da rede municipal de abastecimento (cavaletes ou hidrômetros), e as amostras *in natura* foram obtidas de soluções alternativas de abastecimento, sendo 140 de poços artesianos, 68 de poços rasos e 69 de fontes / minas. As amostras foram coletadas aleatoriamente em 27 municípios pertencentes à 17ª e 18ª regionais de saúde localizadas na região Norte do Estado do Paraná, Brasil.

Pesquisa, Isolamento e Identificação de *E. coli*

A técnica utilizada para detecção de *E. coli* foi a do substrato cromogênico Colilert (SOVEREIGN-BR). Alíquotas foram retiradas das amostras de água positivas para *E. coli*, no kit cromogênico Colilert, e semeadas em placa de ágar MacConkey (MC) (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas, sendo as colônias com características presuntivas de *E. coli* identificadas bioquimicamente através do kit EPM, Milli e Citrato de Simmons (PROBAC-BR). Um total de 295 isolados (um de cada amostra) foi identificado como *E. coli* e estes foram estocados em caldo infusão de coração e cérebro (BHI) (Difco) com 20% de glicerina a -70°C até o uso.

Extração de DNA

O DNA bacteriano foi obtido pelo método de extração por fervura segundo Blanco et al. (1997). As cepas foram cultivadas em ágar LB (Luria-Bertani) a 37°C por 24 horas. As colônias foram suspensas em 300 mL de água Milli-Q (Millipore) estéril, em tubos de microcentrifuga, levadas ao aquecimento em água fervente, por 10 minutos para liberação e desnaturação do DNA bacteriano, imediatamente colocadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios da PCR.

Ensaio de PCR

Todos isolados foram testados quanto à presença das seguintes toxinas e fatores de colonização: LT-I, ST-a,

ST-b, CFA/I, CFA/II, K88, K99 (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Cada reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,0 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1X (Invitrogen) e água Milli-Q (Millipore) estéril para volume final de 25µL. Para observação do produto amplificado, foi utilizada eletroforese em gel de agarose 1,2% (Agargen), preparado em tampão Tris Borato EDTA

(TBE). Na corrida eletroforética, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Os géis foram corados com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) e visualizados com o auxílio de transiluminador Ultra-violeta (UV) ECX-20.M (Vilbert Loumart). As seguintes cepas de ETEC foram utilizadas como controles positivos: H10407 (*lt-I, cfa/I, cfa/II*) (SCHULTSZ et al., 1994), B41 (*st-a, fanC*) (ROOSENDAAL; GAASTRA; GRAAF, 1984), 214/O82 (*st-b*) (OSEK, 2001), O149:K91 (*faeG*) (JONE; RUTTER, 1972). Água foi utilizada como controle negativo das reações.

Tabela 1 – Sequência dos primers pesquisados, tamanho do fragmento de DNA amplificado e referências.

Genes	Produto	Sequência (5' – 3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>st-a</i>	STa	(F)*TCTGTATTATCTTTCCCTC (R)**RATAACATCCAGCACAGGC	186	Schultsz et al. (1994)
<i>st-b</i>	STb	(F)CCCTCAGGATGCTAAACCAG (R)TTAATAGCACCCGGTACAAGC	166	Schultsz et al. (1994)
<i>lt-I</i>	LT-I	(F)GGCGACAGATTATACCGTGC (R)CCGAATTCTGTTATATATGT	696	Schultsz et al. (1994)
<i>cfa/I</i>	CFA/I	(F)CTATTGGTGCAATGGCTCTGACC (R)GCAGCAGCTCAAATTCTTTGGC	352	Hamers et al. (1989)
<i>cfa/II</i>	CFA/II	(F)CCTACTAACCAAGAAGACTGGC (R)GGTGGTGGCAAAGCTAGCAGA	248	Jalajakumari et al. (1989)
<i>faeG</i>	K88	(F)ATCGGTGGTAGTACTACTGC (R)AACCTGCGACGTCAACAAGA	601	Gaastra et al. (1981)
<i>fanC</i>	K99	(F)TGCGACTACCAATGCTTCTG (R)TATCCACCATTAGACGGAGC	450	Roosendaal et al. (1984)

*(F): Primer forward. **(R): Primer reverse

RESULTADOS

Das cepas estudadas, 36 (12,20%) apresentaram o gene *lt-I*, uma (0,34%) apresentou o gene *st-a* e três o *st-b* (1,02%). Quatro cepas (1,36%) apresentaram genes que codificam fatores de colonização relacionados a animais, sendo que as quatro apresentaram o gene *faeG* e nenhuma o gene *fanC*. Seis cepas (2,04%) apresentaram genes que codificam fatores de colonização relacionados a humanos, sendo quatro (1,36%) o gene *cfa/I* e duas (0,68%) o gene *cfa/II*.

Cinquenta e uma (17,29%) cepas apresentaram, pelo menos, um gene que codifica enterotoxina e/ou fator de colonização relacionado à ETEC, mas destas apenas 42 (14,24%) foram caracterizadas dentro do patotipo de ETEC (presença da toxina termoestável (ST) e/ou toxina termolábil (LT)). Uma cepa (0,34%) foi positiva simultaneamente para os genes *lt-I* e *st-b* e outra cepa (0,34%) para os genes *lt-I* e *faeG* (Tabela 2).

Tabela 2 – Perfil genotípico obtido nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de água in natura e tratada.

Perfil genotípico	Nº cepas água in natura	Nº cepas água tratada	Total de cepas (%)
<i>st-a</i>	1	0	1 (0,34%)
<i>st-b</i>	3	0	3 (1,02%)
<i>lt-I</i>	34	2	36 (12,20%)
<i>cfa/I</i>	2	2	4 (1,36%)
<i>cfa/II</i>	2	0	2 (0,68%)
<i>faeG</i>	3	0	3 (1,02%)
<i>lt-I</i> e <i>st-b</i>	1	0	1 (0,34%)
<i>lt-I</i> e <i>faeG</i>	1	0	1 (0,34%)

DISCUSSÃO

Fontes de água são consideradas reservatórios em potencial de *E. coli* (LASCOWSKI et al., 2013). Nas últimas décadas, o consumo de água in natura vem diminuindo; contudo, surtos de diarreias e doenças relacionadas ao

consumo de água vêm crescendo. Segundo dados da organização mundial da saúde (OMS) há cerca de 1,7 bilhões de casos de diarreia somente em crianças no mundo (RICHARDSON et al., 2009; WHO; UNICEF, 2013). Uma explicação para esse crescente número de surtos de diarreia pode ser devido à contaminação da água por microrganismos tanto na fonte quanto no sistema de distribuição ou no armazenamento doméstico da água tratada (BRASIL, 2011).

ETEC tem sido comumente encontrada nos países em desenvolvimento. Ali et al. (2012) encontraram 3,2% de ETEC ao pesquisarem águas destinadas ao consumo humano na Líbia, enquanto que Widmer et al. (2013) encontraram 1,2% de ETEC em águas superficiais de Bangladesh. Em países desenvolvidos a presença de ETEC é raramente reportada. Acredita-se que a falta de saneamento básico seja o fator principal para a elevada presença deste patótipo em países em desenvolvimento (AKTER et al., 2013; SIDHU et al., 2013). No Brasil, ETEC ainda é reportada em diferentes estudos: Rebello; Regua-Mangia (2014) ao analisarem águas superficiais do Rio de Janeiro encontraram 0,6% de ETEC, enquanto que Oliveira et al. (2012), ao pesquisarem água do reservatório Lajeado, em Tocantins, encontram 1,3% de ETEC.

Além das toxinas LT e ST, CFAs também tem sido encontrados em diferentes regiões geográficas do mundo (OH et al., 2014; TORRES et al., 2014). Em um estudo clínico conduzido na Colômbia com 32 isolados de ETEC obtidos de crianças com diarreia, 43,8% apresentaram o CFA/I ou CFA/II (GUERRA et al., 2014). Entretanto, em outro trabalho no qual pesquisaram CFAs, em 261 amostras de crianças diarreicas no Irã, apenas 3,4% possuíam CFA/I e 0,4% CFA/II (NAZARIAN et al., 2014). Os diferentes resultados encontrados nos estudos pode ser devido às diferentes regiões geográficas pesquisadas ou às técnicas empregadas na identificação de CFAs (OYOFO et al., 2001).

A elevada presença de ETEC nas amostras de água reportada neste estudo (14,24%) representa um risco à saúde da população que vive no norte do Paraná. Uma vez na água, as ETEC podem ser ingeridas por humanos e animais ocasionando desde casos simples a mais graves de diarreia. Ressaltamos ainda que a pesquisa de ETEC em amostras de água para consumo humano é a primeira realizada em nossa região.

CONCLUSÃO

Concluímos que dos 295 isolados de água analisados, cinquenta e um (17,29%) apresentaram, pelo menos, um gene que codifica enterotoxina e/ou fator de colonização relacionado à ETEC. Destes, apenas 42 (14,24%) foram caracterizados dentro do patótipo de ETEC devido à presença da toxina termoestável (ST) e/ou toxina termolábil (LT). A presença de ETEC na água para consumo humano pode causar riscos à saúde da população, demonstrando falhas no sistema de tratamento ou de distribuição de água. Portanto, fica comprovado que é fundamental o cuidado com a qualidade microbiológica da água que a

população consome e o tratamento adequado da mesma, principalmente devido à possibilidade da água ser um veículo para a transmissão de cepas para homens ou animais, ou ainda fonte de contaminação de alimentos.

REFERÊNCIAS

- AKTER, S. et al. Prevalence and distribution of different diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulotypes in major water bodies in Bangladesh. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 141, n. 12, p. 1-10, 2013.
- ALI, M. M. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 86, n. 5, p. 866-871, 2012.
- BLANCO, M. et al. 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.**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2958-2963, 1997.
- BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 dez. 2011. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 30 nov. 2014.
- CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Basel, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.**, Austin, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. **Diarrheagenic Escherichia coli**. Chapter 4ª Bacteriological Analytical Manual on line. Food and Drug Administration FDA/CFSA 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>>. Acesso em: 15 set. 2015.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos United Kingdom**. 2. ed. Brasília: Artmed, 2013. 496 p.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009.
- GAASTRA, W. et al. The nucleotide sequence of the gene encoding the K88ab protein subunit of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 41-46, 1981.
- GUERRA, J. A. et al. G. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* clinical isolates from northern Colombia, South America. **Biomed. Res. Int.**, New York, v. 2014, n. 1, p. 1-11, 2014
- HAMERS, A. M. et al. The nucleotide sequence of the first two genes of the CFA/1 fimbrial operon of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, London, v. 6, n. 4, p. 297-309, 1989.
- ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine.**, Kidlington, v. 29, n. 37, p. 6167-6178, 2011.
- JALAJAKUMARI, M. B. et al. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 1685-1695, 1989.
- JONE, G. W.; RUTTER, J. M. Role of the K88 antigen in the patho-

- genesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. **Infect. Immun.**, Washington, v. 6, n. 6, p. 918-927, 1972.
17. LASCOWSKI, K. M. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 114, n. 4, p. 1230-1239, 2012.
18. MADHAVAN, T. P. V.; SAKELLARIS, H. Colonization factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Adv. Appl. Microbiol.**, New York, v. 90, n. 1, p. 155-197, 2015.
19. MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 2-12, 2013.
20. MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 11-13, 2003.
21. NAZARIAN, S. et al. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 78-85, 2014.
22. OH, K. H. et al. Molecular characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients in Korea during 2003-2011. **PLoS ONE.**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. 1-9, 2014.
23. OLIVEIRA, K. W. et al. Antimicrobial resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bathing waters of the Lajeado reservoir in Tocantins, Brazil. **Rev. Ambient. Água**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.
24. OSEK, J. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 13, n. 4, p. 308-311, 2001.
25. OYOFO, B. A. et al. Toxins and colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* among residents of Jakarta, Indonesia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 65, n. 2, p. 120-124, 2001.
26. REBELLO, R. C. L.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 19-27, 2014.
27. RICHARDSON, H. Y. et al. Microbiological surveillance of private water supplies in England – The impact of environmental and climate factors on water quality. **Water Res.**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 2159-2168, 2009.
28. ROOSENDAAL, B.; GAASTRA, W.; GRAAF, F. K. The nucleotide sequence of the genes encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 253-258, 1984.
29. SCHULTSZ, C. et al. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Stool Samples by Using Nonradioactively Labeled Oligonucleotide DNA Probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.
30. SIDHU, J. P. et al. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 79, n. 1, p. 328-335, 2013.
31. TORRES, O. R. et al. Toxins and virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with strains isolated from indigenous children and international visitors to a rural community in Guatemala. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2014.
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025/The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD)**. 2013. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79200/1/9789241505239eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 11 dez. 2015.
33. WIDMER, K. et al. Prevalence of *Escherichia coli* in surface waters of Southeast Asian cities. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 29, n. 11, p. 2115-2124, 2013.
34. ZHOU, H.; ZHU, J.; ZHU, G. Fimbriae of animal-originated enterotoxigenic *Escherichia coli* – a review. **Wei sheng wu xue bao.**, Beijing, v. 4, n. 6, p. 679-686, 2012.

AGRADECIMENTOS

À 17ª Regional da Saúde pela realização das coletas de água. À Universidade Estadual de Londrina e Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

DATA DE ENTREGA DOS ORIGINAIS

Submetido em: 16/06/2015

Aceito em: 09/05/2016