

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA (STEC)  
E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM PEIXES DE  
PISCICULTURAS E DE VIDA LIVRE**

**Marita Vedovelli Cardozo**

Bióloga

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA (STEC)  
E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM PEIXES DE  
PISCICULTURAS E DE VIDA LIVRE**

**Marita Vedovelli Cardozo**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

Cardozo, Marita Vedovelli  
C268d Detecção de Escherichia coli shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre – SP / Marita Vedovelli Cardozo. – – Jaboticabal, 2014  
xx, 77 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Banca examinadora: Caroline Peters Pigatto de Nardi, Patrícia Amoroso, Helio José Montassier, José Moacir Marin

Bibliografia

1. Peixe. 2. Genes de virulência. 3. Patógenos. 4. Saúde pública. 5. PFGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576:639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA (STEC) E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM PEIXES DE PISCICULTURAS E DE VIDA LIVRE

**AUTORA:** MARITA VEDOVELLI CARDOZO

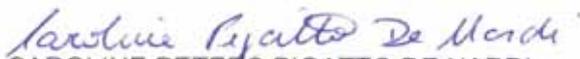
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



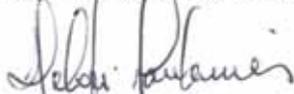
Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI

Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP



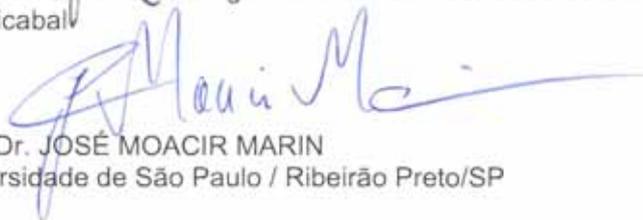
Profa. Dra. PATRÍCIA AMOROSO DE ANDRADE

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos / Barretos/SP



Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN

Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 26 de agosto de 2014.

### **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARITA VEDOVELLI CARDOZO** - Nascida em Jaboticabal, SP, em 22 de junho de 1984, filha de Vanda Vedovelli Cardozo e Oswaldo Pereira Cardozo. Bióloga, graduada em Licenciatura em janeiro 2007 e em Bacharelado em janeiro de 2008, pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2004 a julho de 2007. Foi bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de junho de 2008 a fevereiro de 2009. De março de 2009 à fevereiro de 2011, cursou Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em março de 2011 iniciou o Doutorado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa FAPESP (2011/07358-2) e a obtenção do título foi em agosto de 2014.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*(José de Alencar)*

## **Agradecimentos**

A Deus, por me guiar em todos os caminhos e por me dar a estrutura necessária para vencer todos os obstáculos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, pelos valiosos ensinamentos e amizade nesses anos de convívio.

Aos meus pais, Oswaldo Pereira Cardozo e Vanda Vedovelli Cardozo, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas. À minha irmã Lígia Vedovelli Cardozo Araújo pela torcida, pelo companheirismo e amizade. A vocês, muito obrigada pelo carinho e amor incondicional sempre!

À toda minha família: tias, tios, primas, primos, namorado, cunhado e avó, que são muito importantes e muito presentes em minha vida. Só tenho a agradecer por ter uma família tão unida!

Às meninas do laboratório: Livia Gerbasi Beraldo, Clarissa Araújo, Elisa Schirato, Mariana Beraldo Massoli, Mariana Froner Casagrande e Livia Boarini, pela ajuda na execução do experimento e também pela amizade em todos esses anos.

Ao Prof. Ruben Pablo Schocken-Iturrino, Prof. Antonio Monteiro, Prof. Hélio Montassier, Prof. Ely Nahas, e todos os alunos e funcionários, especialmente nosso técnico João Quintana, do Departamento de Microbiologia Agropecuária, que de maneira direta ou indireta, auxiliaram na realização desse trabalho.

Às amigas Andressa Souza, Luciana Lacerda e meninas da Preventiva, pelo auxílio com rep-PCR e por estarem sempre tão dispostas a ajudar.

Aos amigos Marcinha Gomes, Renato Maluta, Lilian Makino e Ricardo Cavani, pelo auxílio das mais diversas formas e pela presença em tantos momentos.

A todos os meus amigos “da cidade” e “da faculdade” pelos momentos de alegria e descontração!!

Aos proprietários e funcionários das pisciculturas e ranchos, pela permissão das visitas e participação direta na coleta dos animais. E também a todos os amigos que me ajudaram com as coletas (pescar mais de 400 peixes sozinha seria impossível dentro

do prazo do Programa...rsrsrs). Sem a colaboração de vocês, esta pesquisa não seria realizada.

A todos os funcionários da Pós Graduação, da Biblioteca e do Caunesp, pela atenção em todos os momentos necessários.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Doutorado e Auxílio Pesquisa concedidos. Processos número 2011/07358-2 e 2011/15050-8.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Tabelas .....	vii
Lista de Figuras.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Aquicultura.....	03
2.1.1 Piscicultura no Brasil.....	04
2.1.2 Sistemas de produção.....	05
2.1.3 Boas práticas de manejo.....	06
2.2 Utilização de antimicrobianos.....	07
2.2.1 Resistência bacteriana.....	08
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.3.1 STEC.....	11
2.3.2 EPEC.....	12
2.3.3 Genes de virulência relacionados à STEC e EPEC.....	13
2.3.4 Sorotipos.....	15
2.3.5 <i>E. coli</i> em peixes.....	16
2.3.5.1 Legislação Brasileira.....	16

2.4 Diversidade genética.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1 População analisada.....	22
5.2 Coleta e Procedimentos iniciais.....	23
5.3 Extração de DNA.....	24
5.4 Detecção de STEC e EPEC.....	25
5.4.1 PCR de triagem.....	25
5.4.2 PCR confirmatória.....	26
5.5 Detecção de outros genes de virulência.....	28
5.6 Subtipagem do gene <i>stx2</i> .....	28
5.7 Testes bioquímicos.....	28
5.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	29
5.9 Agrupamento Filogenético.....	29
5.10 Sorotipagem.....	30
5.11 Análise de diversidade genética por PFGE.....	30
5.12 Análise de diversidade genética por rep-PCR.....	31
5.12.1 Extração de DNA genômico.....	31
5.12.2 rep-PCR (REP, ERIC e BOX).....	32
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Detecção STEC e EPEC.....	37
6.2 Detecção de outros genes de virulência.....	37

6.3 Subtipagem do gene <i>stx2</i> .....	38
6.4 Testes bioquímicos.....	39
6.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	39
6.6 Agrupamento Filogenético.....	40
6.7 Sorotipagem.....	41
6.8 PFGE.....	41
6.9 rep-PCR.....	41
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## Lista de Abreviaturas

AE - “Attaching and effacing”

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EPECa - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

BFP- Fator de aderência denominado “bundle forming pili”

BHI – Agar “Brain and Heart Infusion”

BPM – Boas Práticas de Manejo

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CH - Colite hemorrágica

CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”

DAEC – *Escherichia coli* de aderência difusa

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF- Plasmídio “EPEC Adherence Factor”

EcL – “Reference Laboratory for *Escherichia coli*” da Universidade de Montreal

EcRc – “*E. coli* Reference Center” da Universidade da Pensilvânia

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC - *Escherichia coli* extra-intestinal

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

FDA – “Food and Drug Administration – Estados Unidos”

GIFT – “Genetic Improvement of Farmed Tilapia”

IAL – Instituto Adolfo Lutz

LEE - “Locus of enterocyte effacement”

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MC - Agar “MacConkey”

MH – Agar “Mueller Hinton”

mL – Mililitro

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

NT – Não tipável

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de base

PB – Proteína bruta

PBS - Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PT - “Pulsetype”

PTT – Púrpura trombocitopênica trombótica

rep-PCR – Técnicas REP, ERIC e BOX PCR conjuntamente

REP – “Repetitive Extragenic Palindromic”

ERIC – “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SHU - Síndrome hemolítica urêmica

STEC - *Escherichia coli* Shigatoxigênica

TEB - Tampão Tris-Borato-EDTA

TSI – Agar “Triple Sugar Iron”

UFC – Unidade formadora de colônia

UPGMA - “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

UV - Ultravioleta

V – Volt

VT – Verotoxina

WHO – “World Health Organization”

µL – Microlitro

## Lista de Tabelas

	<b>Página</b>
1. Genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> e suas funções na patogênese.....	14
2. Número de amostras coletadas em cada estabelecimento visitado.....	22
3. Lista de “primers” e condições das reações usadas nas PCRs.....	34
4. Perfil genético associado aos patótipos STEC e EPEC em fezes peixes.....	37
5. Perfil de virulência dos isolados STEC e EPECa em fezes peixes.....	38
6. Prevalência dos subtipos do gene <i>stx2</i> dos isolados STEC em fezes de peixes.....	38
7. Características bioquímicas dos isolados STEC e EPECa em fezes peixes.....	39
8. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes.....	40
9. Perfil sorológico dos isolados STEC e EPECa em fezes peixes.....	41

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
1. <i>Oreochromis niloticus</i> dissecada para coleta de fezes e fragmento de musculatura.....	23
2. Coleta de água em viveiro.....	24
3. Fluxograma do procedimento utilizado para detecção e isolamento das estirpes STEC e EPECa de peixes.....	27
4. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético dos isolados desenvolvida por Clermont et al. (2000).....	30
5. Associação entre o dendrograma da análise de diversidade genética por PFGE e indicadores de virulência dos isolados STEC e EPECa de peixes.....	42
6. Gel referente a análise de diversidade genética por REP-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes.....	43
7. Gel referente a análise de diversidade genética por ERIC-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes.....	43
8. Gel referente a análise de diversidade genética por BOX-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes.....	43
9. Dendrograma representando a similaridade genética dos isolados STEC e EPECa de peixes realizada por rep-PCR.....	44

## DETECÇÃO de *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA (STEC) E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM PEIXES DE PISCICULTURAS E DE VIDA LIVRE

**RESUMO** - Embora *Escherichia coli* não seja um microrganismo natural do trato intestinal de peixes, sabe-se que a microbiota desses animais está diretamente relacionada à qualidade microbiológica da água em que vivem. Para avaliar a frequência de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC), foram coletadas um total de 472 amostras de fezes e musculatura de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia), bem como da água em que viviam. Nos animais provenientes de pisciculturas, somente uma estirpe STEC (0,2%) foi isolada, e esta apresentou resistência a diversos antimicrobianos das classes das quinolonas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e anfenicóis, enquanto em peixes de vida livre, seis estirpes (6%) foram isoladas, sendo cinco STEC e uma EPECa. Todas as STEC foram classificadas como patogênicas pelo agrupamento filogenético e a EPECa, comensal. Além disso, foram detectados os genes de virulência *astA*, *ehxA*, *saa*, *efa1*, *paa* e *lpfA<sub>O113</sub>* e os sorogrupos O55, O39, O116, H14, H18 e H36. Em relação às variantes da toxina Stx2, foi observada a rara combinação dos subtipos *stx2a*, *stx2c* e *stx2d* em um mesmo isolado. De acordo com a análise de similaridade genética, os isolados são bastante heterogêneos e apresentaram origem clonal diversificada. Os resultados desse estudo evidenciaram que os peixes têm o potencial de transmissão de *E. coli* diarréiogênicas para o ser humano, e também o possível uso indiscriminado de antimicrobianos na criação intensiva desses animais.

**Palavras-chave:** peixes, genes de virulência, patógeno, saúde pública, PFGE.

## DETECTION OF SHIGATOXIGENIC (STEC) E ENTEROPATOGENIC (EPEC) *Escherichia coli* IN FISH FARM AND WILD FISH

**SUMMARY** - Although *Escherichia coli* is not an organism typically found in the fish gut, the microbiota of these animals is directly related to the quality of water in which they live. To evaluate the frequency of shigatoxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli*, a total of 472 fish fecal and muscle samples were collected (*Oreochromis niloticus*, called tilapia), as well as the water in which the fish lived. In animals from fish farms, only one STEC strain (0.2%) was isolated, and showed resistant to several antimicrobial of the quinolone, tetracycline, aminoglycoside and amphenicol classes. In wild fish, six isolates (6%) were obtained, five STEC and one aEPEC. All STEC were classified as pathogenic by phylogenetic grouping, and aEPEC was commensal. In addition, *astA*, *ehxA*, *saa*, *efa1*, *paa*, *lpfAO113* virulence genes, and O55, O39, O116, H14, H18 and H36 serogroups were detected. Regarding Stx2 toxin variants, an unusual combination of *stx2a*, *stx2c* and *stx2d* subtypes was observed. According to the analysis of genetic similarity, the isolates are heterogeneous and showed a diversified clonal origin. The results of this study demonstrated that fish have the potential to transmit diarrheagenic *E. coli* to humans, as well as the possible indiscriminate use of antimicrobials in the intensive farming of these animals.

**Keywords:** fish, virulence genes, pathogen, public health, PFGE.

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* não é habitante natural da microbiota de peixes, porém tem sido isolada com frequência no intestino desses animais, pois ambientes aquáticos contaminados podem transmitir o patógeno (GUZMÁN et al., 2004). É um microrganismo com algumas linhagens patogênicas que se destacam devido ao seu potencial zoonótico emergente.

*Escherichia coli* shigatoxigênicas (STEC) pertencem a um grupo de patógenos associados a diarreia, colites hemorrágicas (CH) que podem evoluir para complicações extraintestinais graves como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica (PTT) (MORA et al., 2005). O principal fator de virulência de STEC é a toxina shiga, sendo considerado um fator chave de patogenicidade (ACHESON, 2000). Existem duas classes de toxina shiga, Stx1 e Stx2, e sete subtipos da toxina Stx2, sendo que alguns estão altamente associados com quadros mais graves da doença (SCHEUTZ et al., 2012).

*Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC) podem ser típicas, as quais possuem o plasmídeo de virulência EAF que codifica o “*bundle-forming pilus*” (*bfp*), necessário para a adesão localizada em células epiteliais; e atípicas, que não são portadoras desse plasmídeo, mas possuem o gene *eae*, que promovem a lesão “attaching and effacing” (A/E) e também demais fatores de virulência codificados na região LEE (NGUYEN et al., 2006).

Ademais, outros genes de virulência encontrados em infecções causadas por estes patótipos estão relacionados à adesão na mucosa intestinal ou a produção de toxinas (GYLES, 2007). Algumas adesinas putativas desempenham um papel importante na virulência desses patógenos, e podem ser divididas em adesinas não fimbriais, as quais incluem *efa1*, *iha*, *toxB* e *saa*; e fimbriais, incluindo principalmente *lpfA*. As STEC e EPEC também podem albergar o gene *astA*, que codifica uma enterotoxina termoestável localizada em plasmídeos; o gene *paa*, que codifica uma proteína cromossomal inicialmente observada em suínos, e o gene *ehxA* que codifica uma enterohemolisina, responsável pela formação de poros e associada com doenças de maior severidade (NGELEKA et al., 2003; COOKSON et al., 2007).

Além desses indicadores de virulência, esses microrganismos apresentam uma diversidade de sorotipos muito grande. O sorotipo O157:H7 é epidemiologicamente significativo em todo o mundo, entretanto, cerca de 250

sorotipos não-O157 foram relatados e mais de 100 deles foram associados a doenças humanas (EKLUND et al., 2001). Tais fatos, juntamente com a utilização de antibióticos de forma indiscriminada na criação dos peixes para consumo humano, possibilitando a disseminação de genes de resistência, tornam esses animais um alimento com potencial de risco na saúde pública (SAPKOTA et al., 2008).

Também referindo-se à saúde pública, um surto na Europa causado por *E. coli* patogênicas envolveu 855 casos de SHU, 2.987 casos de gastroenterite aguda e resultou em 53 mortes. De acordo com relatório do Robert Kock Institute (2011), a infecção foi causada pela ingestão de broto de vegetais contaminados por STEC. Esses patógenos podem entrar na cadeia alimentar humana de várias maneiras, mas é frequentemente através da contaminação direta ou contaminação cruzada de alimentos (PATON; PATON, 1998). Embora surtos por STEC e EPEC em peixes ainda não tenham sido registrados, a maioria dos surtos notificados apresentaram o alimento cru como veículo de infecção, e o fato de que os peixes são muitas vezes ingeridos crus, aumentam significativamente o risco de infecções.

Diversos trabalhos analisaram STEC e EPEC e genes de virulência em humanos, bovinos, ovinos, suínos, bubalinos (CERGOLE-NOVELLA et al., 2007, BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001, MALUTA et al., 2013, BORGES et al. 2012, BERALDO et al., 2014). Entretanto, foram poucos os trabalhos que analisaram a presença de STEC em peixes (KUMAR et al., 2001, MANNA et al., 2008) e nenhum determinou a presença de adesinas putativas em STEC e EPEC em peixes.

Em decorrência disso, este estudo é relevante e tem como objetivo investigar a presença de *E.coli* diarreiogênicas em peixes de criação intensiva e de vida livre, em relação à prevalência de estirpes STEC e EPEC, caracterizar as estirpes quanto à presença de diversos marcadores de virulência relacionados a doenças, bem como determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos e analisar a similaridade dos isolados para esclarecer o quanto esses animais podem contribuir para infecções em seres humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aquicultura

Aquicultura é o cultivo de organismos cujo ciclo de vida se dá total ou parcialmente em meio aquático. Esse conceito é diferente de pesca, que consiste na retirada de organismos aquáticos da natureza sem prévio cultivo (SEBRAE, 2008). Assim como o homem aprendeu a criar aves, suínos e bovinos, a plantar amendoim, trigo, milho e soja, também aprendeu a cultivar pescado. O termo “pescado” compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos, de água doce ou salgada, utilizados na alimentação humana.

A produção de pescado é considerada um dos sistemas de produtividade que mais cresce no mundo e pode ser tanto continental (em água doce), como marinha (em água salgada). Além disso, a aquicultura compreende diversas especialidades: piscicultura, que é a criação de peixes em água doce ou marinha; malacocultura, produção de moluscos como ostras, mexilhões e caramujos; carcinicultura, criação de camarão, caranguejo ou siri; algicultura, cultivo de macro ou microalgas; ranicultura, criação de rãs; e também criação de jacarés. No Brasil, 69,7% da produção aquícola é proveniente de piscicultura continental, com projeções que apontam para um significativo crescimento (MPA, 2014).

Em 2011, a Tailândia e o Japão sofreram grandes perdas causadas por catástrofes ambientais, fazendo com que a produção aquícola caísse em ambos os países, entretanto, os demais países produtores apresentaram grande crescimento, aumentando significativamente a produção de pescado mundial. A China é o maior produtor, seguido da Índia e Vietnã e, de acordo com os dados da produção da Aquicultura mundial (FAO, 2013), os 20 países maiores produtores, produziram juntos 95% de todo o peixe cultivado para consumo no mundo. Sendo que desses 20 países, Noruega, Chile e Brasil, receberam destaque pela significativa evolução na posição do ranking.

A produção mundial hoje está em 126 milhões de toneladas. O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, podendo tornar-se um dos maiores produtores mundiais de pescado. Segundo a FAO (2013), o Brasil produz aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados, e poderá se tornar

um dos maiores produtores do mundo até 2030, ano em que a produção pesqueira nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas.

A vasta rede hidrográfica do Brasil, com 12% da água doce disponível do planeta, um litoral de mais de oito mil quilômetros, e o fato de apresentar a maior diversidade de espécies de peixes do mundo colaboram para o desenvolvimento da aquicultura intensiva e semi-intensiva no país (NAYLOR et al., 2000).

### **2.1.1 Piscicultura no Brasil**

O Brasil ocupa a 12<sup>a</sup> posição no ranking de produtores de peixes para consumo (FAO, 2013). Cada região brasileira é especializada em um tipo de pescado: na região Norte, predominam peixes como o tambaqui e o pirarucu; no sul, predominam as carpas e as tilápias; no centro-oeste, os destaques são o tambaqui, o pacu e os pintados; e nas regiões Nordeste e Sudeste, a tilápia tem grande presença na piscicultura. Em ordem de grandeza para os estados, os principais produtores brasileiros são Ceará, Paraná e São Paulo (OLIVEIRA, 2009).

No Brasil, houve um crescimento no consumo anual de pescado de 6,46 kg para 9,03 kg por habitante/ano entre 2003 e 2009. Conseqüentemente ao aumento do consumo, a produção também apresentou crescimento. A aquicultura cresceu 43,8% entre 2007 e 2009, e fez com que a produção de pescado apresentasse o maior crescimento no mercado nacional de carnes nesse período. A piscicultura atingiu sozinha 60,2% do crescimento entre 2007 e 2009, sendo que somente a produção de tilápia aumentou 105% nesses sete anos (MPA, 2010).

Considerando apenas a piscicultura, a produção de tilápia responde por 38% do total de peixes produzidos em cativeiro. Entretanto, o Brasil possui cerca de 40 espécies de peixes de água doce com potencial para cultivo, além de outras marinhas. Outras espécies nativas devem fortalecer a piscicultura nacional nos próximos anos, como é o caso do beijupirá (*Rachycentron canadum*), um peixe que já está sendo criado em cativeiro em alto mar na costa de Pernambuco, de alto valor no mercado internacional (SEBRAE, 2008).

Hoje, o Brasil é um grande produtor e exportador de diversos produtos como café, etanol, soja e frango. O projeto do país é que, em breve, o mesmo ocorra com a piscicultura nacional (MPA, 2014).

### 2.1.2 Sistemas de produção

Existem quatro tipos de cultivo para a produção de peixes: sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo.

O sistema extensivo é representado pela prática tradicional, em que a intervenção do homem é pequena. Consiste em adicionar os animais juvenis em lagos, açudes ou represas, onde permanecerão até o momento de serem capturados. Neste sistema, não existe o fornecimento de ração aos peixes ou oxigenação mecanizada da água. Geralmente, várias espécies de peixes são cultivadas ao mesmo tempo, sendo denominado de policultivo. Este sistema é muito utilizado quando a piscicultura não é a atividade principal da propriedade, e os animais são coletados aproximadamente 18 meses após a estocagem (ARANA, 2004).

No sistema semi-intensivo, a intervenção do piscicultor é moderada. Existe influência no cultivo através da mecanização da oxigenação da água, da suplementação alimentar e do tratamento da água. As rações são formulações peletizadas, fareladas ou umedecidas, quase sempre balanceadas com 20% a 28% proteína bruta (PB). O tratamento da água é feito através de fertilizantes químicos ou adubos orgânicos. É um sistema adequado para o produtor que pretende fazer o policultivo, com o objetivo de fornecer peixes aos pesque-pagues ou para o comércio de peixes abatidos em menor escala. A safra é cerca de oito meses neste sistema (FITZSIMMONS, 2000).

No sistema intensivo a atuação do piscicultor é fundamental. Apresenta uma produção bem controlada e sistematizada, com o controle de inúmeras variáveis, visando a otimização da criação e o melhor retorno produtivo. Os açudes são constantemente aerados e a adição de fertilizantes orgânicos é praticamente inexistente, pois a promoção da produtividade natural deve ser muito controlada. A principal fonte de alimento dos peixes é a ração peletizada, extrusada ou umedecida, balanceada e fornecida cerca de duas vezes ao dia, de acordo com a fase de desenvolvimento dos animais. O cultivo de peixes em sistema intensivo está evoluindo rapidamente em países em desenvolvimento, sendo que as espécies mais comumente cultivadas são o salmão, atum e a tilápia, sempre em monocultivo, ou seja, somente uma espécie em cada viveiro (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004).

O sistema superintensivo trata-se de um sistema que possui as mesmas características do intensivo, com a utilização de densidade de povoamento maiores. Exige muita dedicação, capacidade técnica e gerencial do piscicultor. Os peixes são cultivados em estruturas apropriadas como viveiros circulares, tanques-rede, raceway's ou canais de concreto. As estruturas de confinamento permitem grande troca de água com o ambiente e no qual os peixes recebem ração nutricionalmente completa e balanceada. A tilápia é uma das espécies de peixes que melhor se adaptou ao sistema superintensivo de produção, e sua safra varia de acordo com a linhagem do animal, sendo que as Tilápias conhecidas como do Nilo ou GIFT ("Genetic Improvement of Farmed Tilapia"), apresentam em média 6 meses de ciclo de cultivo (KUBITZA, 2003).

A produtividade em cada tipo de cultivo varia de acordo a qualidade dos insumos utilizados, como alevinos e ração, e principalmente das técnicas criteriosas de manejo na produção. Nos sistemas extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo, a produtividade alcança, respectivamente, 2.000, 5.000, 10.000 e 40.000 kg de tilápias por hectare de área alagada por ciclo de cultivo (OLIVEIRA, 2009).

### **2.1.3 Boas práticas de manejo**

A importância das Boas Práticas de Manejo (BPM) está sendo cada vez mais difundida entre pesquisadores e produtores, e visa promover uma aquicultura moderna, através de modificações simples e significativas no manejo das pisciculturas. Constituem-se como principais práticas a diminuição da densidade de estocagem nos sistemas de criação, o controle da qualidade de água, a administração de rações balanceadas, a limpeza e manutenção das estruturas, a quarentena para peixes adquiridos, o manejo dos peixes em dias quentes e a retirada de animais doentes (TAVECHIO et al., 2009).

O manejo inadequado em pisciculturas ocasiona estresse nos peixes, aumentando os níveis de cortisol circulante no sangue, queda da eficácia do sistema imunológico, diminuição do consumo alimentar e, conseqüentemente, os animais são facilmente acometidos por parasitos e bactérias nos sistemas de criação (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

Portanto, as BPM são fundamentais para que a atividade seja ambiental e economicamente viável. Pois a produção deve ser sustentável para que não comprometa a qualidade dos recursos hídricos nacionais, e lucrativa, com um plantel livre de doenças e mortalidades. Além das questões ambiental e econômica, as BPM de organismos aquáticos são essenciais para evitar a contaminação dos peixes por patógenos com potencial zoonótico, garantindo um produto de alta qualidade aos consumidores (FAO, 2010).

Sabe-se que as BPM são alternativas preventivas eficientes para evitar infecções por patógenos em pisciculturas. Entretanto, com o crescimento e a expansão da atividade, a prática do aumento da densidade populacional e a introdução de espécies sem o controle sanitário necessário, tornaram-se comuns. Essas condições impróprias favorecem o desenvolvimento de enfermidades ocasionadas por organismos oportunistas (PRETTO-GIORDANO, 2012).

Para minimizar este problema, muitos antimicrobianos são administrados em animais de pisciculturas com finalidades profiláticas ou terapêuticas (GASKINS et al., 2002).

## **2.2 Utilização de antimicrobianos**

As infecções bacterianas podem diminuir drasticamente a produção de organismos aquáticos, minimizando os lucros do produtor. Baseado nisso, é crescente a utilização de antimicrobianos em pisciculturas (CRESCÊNCIO, 2005). Os antimicrobianos são utilizados na piscicultura pela necessidade de tratar e prevenir uma doença, bem como proporcionar maior reprodução e crescimento. Entretanto, poucos fármacos são aprovados na aquicultura brasileira, o que leva ao uso de medicamentos irregulares.

Entre os antimicrobianos mais utilizados na piscicultura, destacam-se aqueles pertencentes às classes das quinolonas, tetraciclinas e aminoglicosídeos e anfenicóis (RIGOS; TROISI, 2005), sendo que os únicos antibióticos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) para uso na aquicultura no Brasil, pertencem à classe dos anfenicóis (Aquaflor) e tetraciclinas (TM 700).

Existem instituições responsáveis pela regulamentação do uso de drogas veterinárias na aquicultura, e os níveis de rigidez nas normativas vigentes variam em cada país. Nos EUA, o número de drogas permitidas na aquicultura é bem maior que no Brasil (PAHOR FILHO et al., 2012). Entretanto, no Brasil e alguns outros países, em que as regulamentações são maiores que a fiscalização, é difícil realizar um controle efetivo dos fármacos que são utilizados nos sistemas de cultivo (BENAVIDES, 2014). Inclusive, embora o MAPA (2010) mantenha o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em produtos de origem animal, que é destinado ao controle de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne, leite, mel e pescado, o plano ainda não estabelece o controle de diversas classes de antimicrobianos em pescados.

Diversos estudos apontam a utilização de antimicrobianos na piscicultura brasileira para fins profiláticos (MAXIMIANO et al., 2005; GASKINS et al., 2002). Pereira et al, (2006) descrevem que a oxitetraciclina é amplamente utilizada em pisciculturas no Brasil, e os autores afirmam que este antimicrobiano é utilizado em tratamentos para infecções bacterianas, profilaxia ou adicionada à ração como promotor de crescimento. Segundo Paschoal et al., (2013), existe uma forte suspeita de que os piscicultores brasileiros estejam utilizando produtos não registrados e relatam ainda que este procedimento é altamente perigoso e ilegal, ocasionando concentração residual na carne do pescado, no ambiente e também resistência bacteriana.

A utilização de antimicrobianos não aprovados e, principalmente, o uso indiscriminado dos medicamentos aprovados representam um perigo à saúde humana. Estas substâncias podem ser tóxicas, alergênicas, cancerígenas, e podem causar resistência bacteriana em patógenos com potencial zoonótico (FDA, 2011). Segundo Schmidt et al., (2000), os padrões de resistência bacterianas em patógenos de peixes são reflexo do uso intensivo de substâncias antimicrobianas.

### **2.2.1 Resistência bacteriana**

A resistência aos antimicrobianos é a capacidade das bactérias resistirem aos efeitos de um antibiótico devido a mutações ou produção de enzimas que causam a eliminação da eficiência dos antimicrobianos para combatê-los (ÁVILA et al., 2011).

A resistência bacteriana pode ser disseminada através de transmissão vertical ou horizontal. A transmissão vertical, também chamada de clonal, ocorre quando uma bactéria se divide e tem todo seu genoma duplicado, originando uma nova célula idêntica. A transmissão horizontal, é quando bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes trocam genes de resistência por transferência de material genético através de processos como, conjugação, transdução e transformação (FROST et al., 2005).

Com o desenvolvimento dos antimicrobianos e das vacinas, acreditou-se que as doenças infecciosas não ofereciam perigo aos animais e aos seres humanos. Mas a rápida expansão global de bactérias resistentes mostrou que a situação não era favorável (MACCORMICK, 1998), pois o surgimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência (GRACE et al., 2006; PATERSON, 2006). Inclusive, são comuns os casos em que o microrganismo é resistente a uma ampla variedade de antimicrobianos, tornando o tratamento de uma infecção difícil ou, até mesmo, impossível (ÁVILA et al., 2011).

Existem diversos casos de resistência bacteriana na microbiologia clínica. A incidência de Enterococos resistente à Vancomicina, considerado o mais poderoso antibiótico de "último recurso", aumentou até 25% nos Estados Unidos em 10 anos de uso (WILLEMS et al., 2005). A penicilina, antibiótico que revolucionou a saúde humana há 50 anos, apresentou 79% de isolados de *Staphylococcus pneumoniae* resistentes na África do Sul (ADAM, 2002). Doenças que antes eram consideradas erradicadas, como a tuberculose, estão reincidindo por causa da resistência aos antimicrobianos (WHO, 2000).

Também são muitos os casos de resistência bacteriana na aquicultura. O aumento da resistência de *Aeromonas* à oxitetraciclina, sulfadiazina / trimetoprim, e ao ácido oxolínico é cada vez mais significativo. Inclusive, 48% dos peixes analisados em fazendas da Dinamarca, apresentaram níveis de multirresistência, ou seja, uma espécie bacteriana insensível a diversos antimicrobianos (SCHMIDT et al., 2001a). Em estudo realizado na Austrália, Akinbowale et al., (2007) encontraram que bactérias isoladas a partir de animais cultivados em diversas formas de aquicultura, albergavam ampla variedade de genes de resistência à tetraciclina, os quais inclusive foram transferidos, in vitro, para outras bactérias de origem diferente. Segundo Gonzalez (2002), o surgimento de casos de resistência bacteriana é um

grande entrave na aquicultura atualmente, que coloca em risco a saúde pública justamente pela transferência dos genes de resistência.

### **2.3 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma espécie bacteriana pertencente à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos Gram negativos, bastonetes, não esporulados e móveis, com presença de flagelos peritríqueos. Possuem metabolismo respiratório e fermentativo, pois são anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de crescimento a 37°C (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005). Bioquimicamente são classificados como oxidase e catalase negativas, fermentadores de lactose e produtores de indol (EDWARDS; EWING'S, 1986).

*E. coli* pertence a um grupo de microrganismos geneticamente heterogêneo e constituintes da microbiota intestinal natural dos mamíferos e aves, portanto seus membros são geralmente comensais. Entretanto apresentam linhagens patogênicas muito versáteis, que causam diversas doenças intestinais e extra-intestinais por meio de fatores de virulência que afetam uma ampla variedade de processos celulares (KAPER et al., 2004, DEAN et al., 2005; GYLES, 2007).

Várias linhagens de *E. coli* adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem uma maior capacidade em se adaptar a novos nichos e ocasionar um amplo espectro de doenças. As diversas combinações desses fatores de virulência originaram linhagens com patótipos específicos de *E. coli* que são capazes de causar doença em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004).

Existem patótipos causadores de doenças extra-intestinais, também conhecidas como ExPEC. Fazem parte deste grupo as *E. coli* uropatogênicas (UPEC), que causam infecções no trato urinário; *E. coli* associada a meningite (MNEC), responsável por casos de meningite e septicemia e *E. coli* patogênica aviária (APEC), um patótipo animal responsável por infecções respiratórias em aves.

Já as linhagens de *E. coli* causadoras de infecções intestinais envolvem seis categorias: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Dentre estas categorias, as STEC e EPEC destacam-se devido ao seu potencial zoonótico emergente (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

### 2.3.1 STEC

*E. coli* shigatoxigênicas (STEC), também descrita por alguns autores como *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou ainda *E. coli* produtoras de verotoxina (VTEC), pertencem a um importante e emergente grupo de patógenos associados com um largo espectro de doenças em humanos, incluindo diarreia, colites hemorrágicas (CH) que podem evoluir para complicações extraintestinais graves como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica (PTT) (MORA et al., 2005).

Reconhecida pela primeira vez como causa de doença humana em 1982, o principal reservatório de STEC é o trato intestinal de bovinos e surtos iniciais foram associados ao consumo de hambúrgueres mal cozidos. Posteriormente, uma grande variedade de itens alimentares têm sido associados a doença, incluindo salsichas, salames, leite não pasteurizado, melão, rabanete, folhas verdes em geral e até água potável (KAPER et al., 2004).

A toxina Shiga, também conhecida como verotoxina (VT) é o principal fator de virulência de STEC, sendo considerado um fator chave em patogenicidade (ACHESON et al., 2000). Duas classes de toxina Shiga têm sido identificadas, são elas Stx1 e Stx2, codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. A toxina Shiga (Stx1) é 98% homóloga em estrutura biológica com a toxina Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (PATON; PATON, 1998), e 60% da toxina Stx2 é homóloga a toxina Stx1, ambas produzidas pela *E. coli*, e elas são antigenicamente distintas (NATARO; KAPER, 1998).

O gene *stx* está localizado no genoma de bacteriófagos, integrando-se ao cromossomo da célula hospedeira (GOBIUS et al., 2003). A presença desses genes em bacteriófagos possibilita não somente a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, mas também a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. Algumas STEC também podem ser portadoras de uma ilha de patogenicidade homóloga à ilha LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”) existente em EPEC, e causarem lesões do tipo “attaching and effacing”, codificadas pelo gene *eae* (KAPER et al., 2004). Tais fatores caracterizam as STEC como possíveis carreadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, ou pelo menos um desses genes.

A toxina Stx2 ainda possui diversos subtipos, sendo que alguns estão altamente associados com quadros de doenças graves (SCHEUTZ et al., 2012). A identificação dos subtipos dessa toxina é uma técnica amplamente utilizada em

pesquisas com STEC, pois diferenças nas sequências de aminoácidos presentes nas toxinas faz com que algumas variantes da Stx2 não sejam patógenos humanos ou estejam associadas a um tipo mais brando da doença. Enquanto outros subtipos estejam altamente associados com complicações extraintestinais graves, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (PERSSON et al., 2007). Após essas descobertas, a necessidade de identificar as variantes da Stx2 aumentou significativamente.

Existiam duas técnicas amplamente utilizadas para subtipagem da toxina Stx2, RFLP e sequenciamento, e também uma inconsistência na nomenclatura da toxina, pois mais de um sistema de classificação era utilizado (PERSSON et al., 2007; SLANEC et al., 2009), o que ocasionavam dúvidas na caracterização das variantes de *stx2* em cepas STEC. Baseado nisso, na última conferência VTEC - "8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)" - realizado em Amsterdam em 2012, pesquisadores entraram em um consenso após a divulgação de um novo resultado de pesquisa sobre esse tema. Um novo método de subtipagem através de PCR foi desenvolvido e testado por diferentes centros de pesquisa no mundo, com o objetivo de criar uma uniformização da metodologia e da nomenclatura para as variantes da toxina Shiga. Portanto, a subtipagem do gene *stx2* agora é baseada nesse novo protocolo desenvolvido por Scheutz et al. (2012) e esta nova técnica consiste em determinar as 7 variantes do gene *stx2* através de PCR.

### **2.3.2 EPEC**

Outra importante categoria de *E. coli* são as enteropatogênicas (EPEC), responsáveis pela diarreia aguda principalmente em crianças e neonatos (DEAN et al., 2005). EPEC foi o primeiro patótipo de *E. coli* descrito e após grandes surtos de diarreia infantil no Reino Unido, pesquisadores perceberam a diferença sorológica entre estirpes de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia e de crianças saudáveis (KAPER et al., 2004).

A principal característica para se definir uma cepa como EPEC é promover a lesão "attaching and effacing" (A/E), codificadas pelo gene *eae* presente em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (DONNENBERG; WHITTAM, 2001; KAPER et al., 2004). Nas lesões A/E ocorrem a destruição das microvilosidades intestinais e

um rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece fixada (MOXLEY; SMITH, 2010).

As EPEC podem ser classificadas em típicas e atípicas. EPEC típicas possuem o plasmídeo de virulência EAF que codifica o “bundle-forming pilus” (*bfp*), necessário para a adesão localizada em células epiteliais. Por outro lado, as EPEC atípicas não são portadoras do plasmídeo EAF, mas possuem o gene *eae* e demais fatores de virulência codificados na região LEE (NGUYEN et al., 2006). Em trabalho realizado no Brasil, foram encontrados 11% de EPEC em isolados de fezes de crianças com diarreia, sendo que 2% e 9% dos casos foram de EPEC típicas e atípicas, respectivamente (MORENO et al. 2010).

### 2.3.3 Genes de virulência relacionados à STEC e EPEC

A produção e expressão dos vários fatores de virulência possibilitam que diferentes grupos de *E. coli* se fixem às células epiteliais intestinais do hospedeiro por meio de fímbrias ou adesinas. Esta ligação leva a proliferação bacteriana no trato intestinal e a indução de diarreia, como resultado da ação das toxinas nos enterócitos (NGELEKA et al., 2003).

Existem diversos genes de virulência encontrados em infecções por STEC e EPEC, e em sua maioria, estão relacionados à adesão na mucosa intestinal (GYLES, 2007). Algumas adesinas putativas codificadas por genes presentes no cromossomo ou em plasmídeos desempenham um papel importante na virulência desses patógenos, e podem ser divididas em adesinas não fimbriais, as quais incluem *efa1*, *lha*, *toxB* e *saa*; e fimbriais, incluindo *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub>.

As STEC e EPEC também podem albergar o gene *ehxA* que está contido em um plasmídeo que codifica uma enterohemolisina, responsável pela formação de poros nas células eucarióticas e associada com doenças de maior severidade (TOMA et al., 2004, COOKSON et al., 2007). Sua produção está, geralmente, associada ao plasmídeo pO157, mas os genes da enterohemolisina também podem ser encontrados em outros plasmídeos de alta massa molecular (BRÜNDER et al., 1999).

O gene *astA*, codifica uma enterotoxina termoestável localizada em plasmídeos. Inicialmente, essa toxina foi encontrada em EAEC, das quais quando possuíam o gene *astA* representavam um importante fator de virulência na patogênese da diarreia em estirpes isoladas de suínos. Outro gene inicialmente observado em suínos é o *paa*, que codifica uma proteína cromossomal associada a lesões A/E nesses animais, no entanto, o papel de *paa* na patogênese da diarréia ainda precisa ser determinado (NGELEKA et al., 2003, BATISSON et al., 2003).

Estes fatores de virulência, além dos tradicionais que caracterizam cada patótipo, exercem papel importante na patogênese. Inclusive, genes relacionados à ExPEC já foram observados em estirpes de *E.coli* diarreioagênicas (WU et al., 2007) e genes associados a *E. coli* causadora de diarreia já foram encontrados em ExPEC (ABE et al., 2008). A Tabela 1 descreve o papel de diversos fatores de virulência de *E. coli* na patogênese (BATISSON et al., 2003; KAPER et al., 2004).

Tabela 1. Genes de virulência de *Escherichia coli* e suas funções na patogênese

Gene	Fator de virulência	Função	Localização
stx1	shigatoxina 1	toxina	bacteriófago
stx2	shigatoxina 2	toxina	bacteriófago
eae	intimina	adesão	cromossomo
bfp	bundle-forming pili	pilli tipo IV	plasmídeo
ehxA	enteroemolisina	toxina	plasmídeo
iha	adesina homóloga a IrgA de <i>Vibrio cholerae</i>	adesão	cromossomo
toxB	proteína com homologia às toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	adesão	plasmídeo
saa	adesina autoaglutinante de STEC	adesão	plasmídeo
efa1	fator para aderência de STEC	adesão	plasmídeo
<i>lpfA</i> <sub>O113</sub>	fímbria polar longa	adesão	cromossomo
<i>lpfA</i> <sub>O157/OI-141</sub>	fímbria polar longa	adesão	cromossomo
<i>lpfA</i> <sub>O157/OI-154</sub>	fímbria polar longa	adesão	cromossomo
paa	proteína associada a “attaching-effacing” em suínos	adesão	cromossomo
astA	enterotoxina termoestável de <i>E. coli</i> enteroagregativa 1 (EAST-1)	toxina	plasmídeo

Fonte: Adaptado de BATISSON et al. (2003) e KAPER et al. (2004)

### 2.3.4 Sorotipos

A superfície da bactéria é composta de estruturas antigênicas que são fundamentais para a classificação de vários grupos de *E. coli*. Os patótipos de *E. coli* se caracterizam por compartilharem antígenos que definem sorogrupos, baseados apenas no antígeno O; ou sorotipos, baseados nos antígenos O e H (KAPER et al., 2004, TRABULSI et al., 2005). O antígeno somático “O” é termoestável e corresponde a uma das frações do principal componente da parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS). O antígeno flagelar “H” é termolábil, de natureza proteica conhecida como flagelina (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Durante décadas, os mecanismos pelos quais as *E. coli* patogênicas causavam diarreia eram desconhecidos e, portanto, os patótipos só poderiam ser identificados através da sorotipagem. De acordo com presença dos antígenos, foi possível estabelecer a sorotipagem das amostras de *E. coli* e associar com diversas doenças (ORSKOV; ORSKOV, 1992). A diversidade dos sorotipos que esses microrganismos apresentam é muito grande, e, embora o sorotipo O157:H7 esteja associado à maioria dos surtos causados por STEC descritos mundialmente, pesquisas indicam que a incidência deste sorotipo vem diminuindo substancialmente (CDC, 2006). Em contraste, os sorotipos não-O157 vem sendo isolados com maior frequência à partir de amostras fecais de pacientes com SHU (BANATVALA et al., 2001).

Atualmente, com os avanços na compreensão da patogênese das *E. coli* juntamente com os estudos em biologia molecular sobre os fatores de virulência, sabe-se que os produtos gênicos estão mais diretamente associados à patogenicidade que os antígenos de superfície. Portanto, somente a sorotipagem não é suficiente para caracterizar uma cepa de *E. coli* como patogênica, embora existam diversas associações entre sorotipos e virulência, bem como entre sorotipos e doenças (FORBES et al., 2002; KAPER et al., 2004).

### **2.3.5 *E. coli* em peixes**

Até 1950, *E. coli* era considerada habitante não patogênica do trato intestinal dos animais conhecidos, até então, de “sangue quente”, hoje denominados endotérmicos (WASTENSON, 2001). Como os peixes são animais ectotérmicos, não apresentam *E.coli* na microbiota intestinal normal, entretanto, a água contaminada em que esses animais vivem pode transmitir o patógeno.

Em trabalho realizado em Minnesota com *E. coli* em peixes bentônicos e pelágicos, foi encontrado 42% de positividade nos peixes bentônicos e 4% nos pelágicos. Os autores observaram ainda que, as *E. coli* isoladas dos peixes eram idênticas as de animais de sangue quente da região, evidenciando que o peixe foi contaminado através da água com fezes desses animais (HANSEN et al., 2008). Na Índia, analisando STEC em frutos do mar, 3% das amostras de peixe fresco foram positivas para esta estirpe (KUMAR et al., 2001). Barbosa et al., (2014) analisando peixes de pesque pagues no Brasil, encontrou 115 estirpes de *E. coli*, entre as quais 81 (70%) foram sorogrupadas como EPEC, 5 (4%) como STEC e 8 (7%) como EIEC.

Na revisão realizada, foi observado que estudos encontraram *E. coli* em peixes, mas são poucos os trabalhos que analisaram as linhagens deste patógeno e, dentre eles, nenhum determinou a presença de adesinas putativas nas STEC e EPEC.

#### **2.3.5.1 Legislação brasileira**

Baseado no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1952), fica estabelecido que o pescado fresco próprio para consumo deverá apresentar características organolépticas regulares (olhos transparentes, guelras róseas ou vermelhas, escamas brilhantes, carne firme, entre outras), sem mencionar características referentes à qualidade microbiológica. Já o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado), através da Portaria 185 de 1997, estabelece que “quando examinado segundo os métodos adequados de colheita de amostras e análise, o produto deverá estar: a) isento de microrganismos patogênicos e parasitas que possam representar perigo para a

saúde do consumidor. b) isento de substâncias que derivem de microrganismos em quantidades que possam apresentar perigo para a saúde do consumidor”.

Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), através da RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece padrões para os diferentes grupos de produtos alimentícios, incluindo pescado, para fins de registro e fiscalização. Para pescado “in natura”, resfriados ou congelados não consumidos crus, *Salmonella* sp. deve ser ausente e *Staphylococcus* coagulase positiva deve apresentar contagem máxima de  $10^3$  UFC/g. Para pescados secos, salgados, em semiconserva, defumados, produtos à base de pescados (hamburgueres e similares) e pescados pré cozidos, empanados ou não, refrigerados ou congelados, é permitido até  $10^2$  UFC/g de Coliformes a 45°C, e os mesmos critérios em relação a *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva são mantidos. A ANVISA estabelece também que, caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, isso deve ser apresentado no laudo analítico.

Mesmo não apresentando uma legislação específica para STEC ou EPEC, a ANVISA classifica alimentos destinados ao consumo humano como “produto em condições sanitárias insatisfatórias” quando os resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra ou demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

## 2.4 Diversidade genética

O conceito básico das técnicas de diversidade genética propõe que amostras bacterianas epidemiologicamente relacionadas possuem um precursor comum. Diversos métodos para analisar a diversidade genética de microrganismos foram desenvolvidos, entre eles rep-PCR e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

A técnica de rep-PCR, é baseada na amplificação de sequências repetitivas de DNA através de PCR. Utiliza “primers” complementares de sequências de DNA repetitivas altamente conservadas e presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias Gram-negativas e várias Gram-positivas. Três sequências repetitivas foram identificadas: sequência REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”) de 35-40 pares de base (pb), sequência ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) de 124-127 pb, e o elemento BOX de 154 pb. Os protocolos

correspondentes são denominados REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR, e rep-PCR, para as três técnicas coletivamente (ALVES et al., 2003).

A aplicação da técnica rep-PCR (REP, ERIC e BOX conjuntamente) aumenta o poder discriminatório quando comparado com uma das técnicas utilizada isoladamente (OLIVE; BEAN 1999). Este método amplifica um alvo genético conhecido, o qual é designado por elementos repetitivos e, quando dois elementos repetitivos estão localizados próximos entre si, a região que fica entre os mesmos será amplificada (VERSALOVIC et al., 1991). A variabilidade dos sítios de inserção das sequências repetitivas pode levar a diferenças no tamanho do fragmento que são amplificados caracterizando cada linhagem de bactéria (WEIGEL et al., 2004).

Vários estudos têm apontado a rep-PCR como uma técnica adequada para a identificação e classificação de bactérias, em análises epidemiológicas de patógenos humanos. De acordo com os resultados de Versalovic et al. (1991), rep-PCR pode discriminar espécies e também linhagens bacterianas. Borges et al. (2003) conseguiram demonstrar, através desta técnica, a diversidade existente entre isolados de *E. coli* em amostras de água no Rio Grande do Sul.

Já a técnica de PFGE, é considerada a ferramenta “padrão ouro” para diferenciação clonal de diversos patógenos bacterianos (PERSING, 2004). Por ter um elevado poder de diferenciação (OLIVE; BEAN, 1999), tem grande valor epidemiológico na diferenciação de linhagens patogênicas e no monitoramento de sua propagação na população. Este método tem se mostrado muito eficiente para identificar clones de *E. coli* que causam os surtos de diarreia (LEOMIL et al., 2005).

Esta técnica consiste na separação de fragmentos de DNA de alto peso molecular, obtidos pela digestão do DNA cromossomal da bactéria através da utilização de enzimas de restrição, sendo que a enzima de restrição de eleição para a diferenciação de *E. coli* é a *Xba*I. O perfil de restrição gerado é utilizado para comparação clonal das amostras (PERSING, 2004)

Para separação destes fragmentos é utilizada uma corrente eletroforética especial, na qual a direção e intensidade dos pulsos elétricos aplicados são alteradas em diferentes intervalos de tempo, pois fragmentos de alto peso molecular não se movem através da eletroforese convencional. A eletroforese convencional limita a análise de DNA com fragmentos de no máximo, 20 a 50 kb. Acima destes tamanhos, não existe diferenças de mobilidade que permitam a separação de fragmentos de acordo com o peso molecular. Com a alternância constante do campo

elétrico, as moléculas são forçadas a modificar a orientação em que se movem, e, quanto mais longa for a molécula, maior o tempo que necessita para que encontre uma orientação que favoreça o movimento ao longo do gel (ALVES, 2003).

Diferentes metodologias para execução do PFGE já foram descritas, fato que limitava a reprodutibilidade e a comparação de resultados entre laboratórios. Para uma universalidade, foi criado o protocolo "PulseNet", por meio da colaboração de diferentes laboratórios do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (RIBOT et al., 2006).

PFGE e rep-PCR vem sendo amplamente utilizadas para análise de similaridade de microrganismos (VERSALOVIC, 1991). Weigel et al. (2004) compararam rep-PCR com o PFGE, e concluíram que ambas as técnicas foram capazes de diferenciar isolados do mesmo sorovar de Salmonella.

A maior vantagem das técnicas baseadas em PCR é que são simples, com fácil disponibilidade de equipamentos e rápidas. O PFGE possui alta reprodutibilidade, mas apresenta como desvantagem o fato de que a maioria dos protocolos demoram cerca de cinco dias para obtenção de resultado. Através das vantagens e desvantagens de cada técnica, é que se elege a melhor para cada linhagem estudada em cada grupo de pesquisa.

Fato incontestável é que, as análises de diversidade genética são fundamentais para melhor compreensão sobre os mecanismos evolutivos e o surgimento de cepas virulentas e reservatórios de cepas bacterianas (PERSING, 2004).

### 3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as considerações apresentadas e que:

- A expansão da aquicultura no Brasil e o aumento no consumo da carne de peixe, especialmente cru, tornam-se necessárias maiores exigências na qualidade microbiológica desses produtos;
- Apesar de *E.coli* não ser habitante natural da microbiota dos peixes, a água em que esses animais vivem podem transmitir o patógeno;
- *E.coli* patogênicas têm sido isoladas frequentemente em diversas espécies animais e alimentos, e inclusive, é o agente patogênico responsável por diversos surtos de toxinfecção alimentar;
- STEC e EPEC podem apresentar agravantes de virulência relacionados a presença de adesinas putativas, enterohemolisinas e variantes de stx2;
- A legislação brasileira considera como produto em condições sanitárias insatisfatórias quando os resultados analíticos demonstram a presença de microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor;
- O estresse causado pelo sistema de criação intensivo faz com que utilização de antibióticos em piscicultura seja elevada, possibilitando a propagação de genes de resistência aos seres humanos;
- Apesar de alguns trabalhos terem analisado a presença de *E.coli* em peixes, poucos avaliaram a presença de STEC, e nenhum deles determinou a presença de EPEC, adesinas putativas e outros marcadores de virulência.

#### 4 OBJETIVOS

- Investigar a presença de estirpes STEC e EPEC em amostras de fezes e musculatura de peixes provenientes de pisciculturas e de vida livre, bem como da água em que viviam os animais coletados;
- Caracterizar os isolados STEC e EPEC em relação à presença de genes relacionados a outros fatores de virulência, com ênfase para os codificadores de adesinas putativas;
- Investigar nas amostras positivas para Stx2, as variantes dessa toxina;
- Determinar o agrupamento filogenético dos isolados STEC e EPEC;
- Determinar o sorotipo dos isolados STEC e EPEC;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados frente a diversos antimicrobianos;
- Estabelecer a relação de diversidade genética dos isolados STEC e EPEC por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e por rep-PCR.

## 5 Material e Métodos

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 04076/14.

### 5.1 População analisada

As amostras foram coletadas de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, vulgarmente denominada de Tilápia, provenientes de 2 tipos de criação: intensiva e extensiva. Para tal, foram visitados seis diferentes pisciculturas e três diferentes ranchos localizados na região nordeste do Estado de São Paulo - Brasil, no período de dezembro de 2011 à maio de 2012.

De um total de 472 amostras coletadas, 373 amostras eram provenientes de animais de pisciculturas (275 de fezes, 80 de musculatura e 18 de água dos viveiros) e 99 amostras de peixes de vida livre (90 de fezes e 9 de água dos rios).

A diferença nos números em cada variável de amostra ocorreu porque em algumas propriedades ocorria o abate dos animais para posterior venda de filé de peixe, e, portanto, não foi possível coletar um fragmento da musculatura para não prejudicar a produção. A distribuição das amostras coletadas em cada estabelecimento está detalhada na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos e número de amostras coletadas em cada estabelecimento visitado

Amostras	Estabelecimentos									Total
	Pisciculturas						Ranchos			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Fezes	50	45	15	50	15	100	30	30	30	365
Musculatura	50	-	15	-	15	-	-	-	-	80
Água	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
Total	103	48	33	53	33	103	33	33	33	472

## 5.2 Coleta e procedimentos iniciais

Dois tipos de pisciculturas foram visitados: para fins comerciais e de lazer (pesque-pagues). Em pisciculturas comerciais com abatedouro próprio, os animais eram capturados dos viveiros com o auxílio de redes, e as amostras foram coletadas à medida em que os animais eram abatidos. Em pisciculturas para fins de lazer, os animais foram comprados, depositados em tanque com gelo para redução do metabolismo, para serem posteriormente dissecados de forma asséptica (Figura 1).

Já as amostras de animais de vida livre foram coletadas em rios ou açudes de ranchos e sítios, respectivamente, nos quais os pescadores e/ou proprietários comercializavam os peixes. A coleta era realizada logo após a pesca.



Figura 1. *Oreochromis niloticus* dissecada para coleta de fezes e fragmento de musculatura.

Para a obtenção das amostras de água, três amostras com aproximadamente 500 mL de água de superfície foram coletadas em frascos estéreis e em pontos distintos do mesmo viveiro ou rio/açude em que foram capturados os peixes em cada estabelecimento visitado (Figura 2).

Depois de coletadas, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas até o Laboratório de Bacteriologia da FCAV-UNESP de Jaboticabal.

No laboratório, os peixes foram dissecados de forma asséptica, utilizando pinças, tesouras e “swabs” estéreis. Cada amostra de “swab” fecal e do fragmento de musculatura foi transferida para tubos contendo 5 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI – Himedia, Índia) e foram incubadas a 37°C por 18h. As amostras de água foram filtradas em membrana Millipore (Millipore Corporation, EUA) com 0,45 µm de porosidade e 30mm de diâmetro, e estas, transferidas para placas de ágar Mac Conkey (MA – Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, colônias características de *E. coli* presentes nas placas de MC, as quais são rosadas e cujo meio básico se mantém vermelho, foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI e foram incubadas a 37°C por 18h.



Figura 2. Coleta de água em viveiro.

### 5.3 Extração de DNA

Após o período de incubação das culturas multiplicadas no caldo BHI, foi realizada a extração do DNA através de um protocolo de lise térmica segundo a técnica proposta por Keskimaki et al. (2001) com pequenas modificações.

Nesta técnica, 1 mL da cultura foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 15.000 rpm por 2 minutos para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) e agitadas em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada por centrifugação e o processo de lavagem repetido, dessa vez com 500 µL de água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, EUA) estéril. Após essa lavagem, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente. Após esse período, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 2 minutos e do qual foi retirado uma alíquota de 300 µl do sobrenadante (DNA) e transferido para outro tubo eppendorf. Esse material lisado, foi estocado em freezer a -80°C. O produto oriundo dessa preparação foi utilizado para a realização da PCR de triagem, para a detecção de STEC e EPEC.

Logo após a extração do DNA, todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C, em tubos contendo 750 µL de glicerol e 750µL do caldo BHI com a cultura de bactérias para análises futuras.

#### **5.4 Detecção de STEC e EPEC**

A identificação e isolamento bacteriano foram realizados conforme o procedimento do protocolo do Reference Laboratory for *Escherichia coli*, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal (disponível em [http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC\\_PCR\\_en.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx) ).

##### **5.4.1 PCR de triagem**

Para detecção de STEC e EPEC, foi realizada uma PCR de triagem em que foram pesquisados os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*, sendo utilizado como controle positivo a cepa EcL 6611. Para tal, uma alíquota de DNA (4 µL) foi acrescentada à mistura contendo 0,4 µL de dNTP (10 mM), 2 µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 1.6 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µL de cada primer 10 pM, e uma unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas, Europe). Água MilliQ foi adicionada até completar o volume total de 20µL. Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo

desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos. A descrição dos “primers” encontra-se na Tabela 3.

Após cada PCR, acrescentava-se de 5µL de corante de front (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) no produto da reação e foi aplicado marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA) em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) e separados por eletroforese (70V/1h). Os produtos de amplificação foram visualizados por exposição do gel em luz UV e fotografado.

As amostras positivas para pelo menos um dos genes analisados eram submetidas às próximas etapas.

#### 5.4.2 PCR confirmatória

As culturas das amostras estocadas no freezer a -80°C que apresentaram positividade para qualquer um dos genes pesquisados na PCR de triagem (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*) foram semeadas por esgotamento em placa de ágar MC e incubadas a 37°C por 24h.

Em seguida, dez colônias com características de *E. coli* foram repicadas em uma placa contendo ágar BHI da seguinte forma: 5 colônias pertenceram a um grupo denominado “A”, e outras 5 colônias a um grupo denominado “B”. Após período de incubação de 37°C por 24h, um “pool” de cada grupo foi transferido para tubo contendo caldo BHI, portanto, dois tubos por amostra. Após incubação, cada “pool” foi submetido à extração de DNA e PCR para confirmação dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*.

Nessa fase, o “pool” que apresentasse resultado positivo para pelo menos um dos genes investigados na PCR confirmatória foi selecionado, e as 5 colônias pertencentes a este “pool” foram individualmente avaliadas conforme descrito anteriormente (transferência para caldo BHI, realização de extração de DNA e PCR). Então, a colônia positiva para pelo menos um dos genes em questão, foi considerada um isolado.

Os isolados foram estocados em glicerol no freezer -80°C para a realização das análises futuras. O fluxograma representativo do procedimento utilizado para detecção e isolamento de ETEC e EPEC está ilustrado na Figura 3.

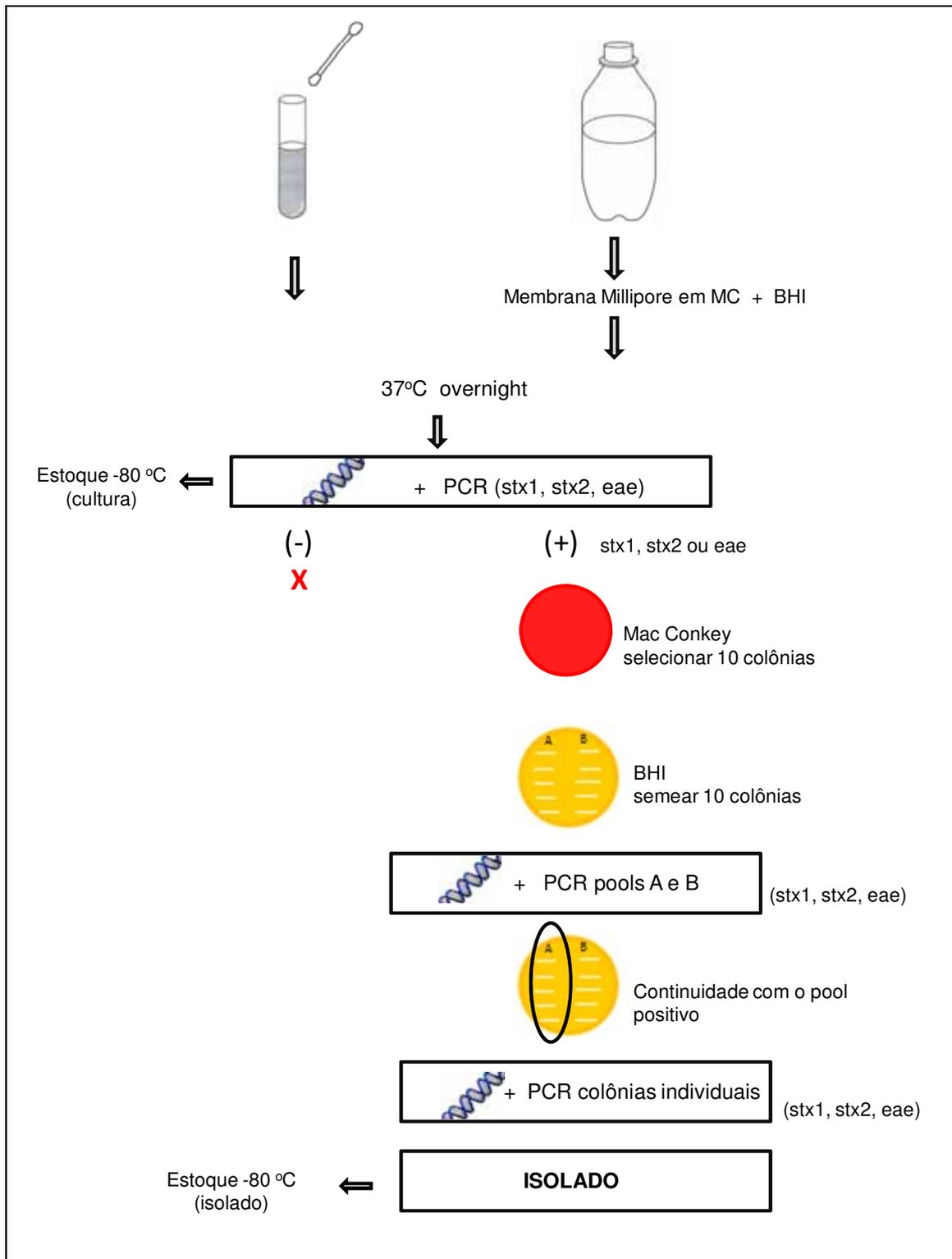


Figura 3. Fluxograma do procedimento utilizado para detecção e isolamento das estirpes STEC e EPEC de peixes.

## 5.5 Detecção de outros genes de virulência

Após a obtenção dos isolados, foi realizada PCR para detecção de outros genes de virulência nas estirpes, com as mesmas condições descritas anteriormente e, para tal, foram pesquisados os genes *bfp*, *ehxA*, *saa*, *iha*, *toxB*, *efa1*, *lpfA<sub>O113</sub>*, *lpfA<sub>O157/OI-141</sub>*, *lpfA<sub>O157/OI-154</sub>*, *astA* e *paa*, sendo utilizados como controles positivos as cepas E2348/69, EDL933, EcL10600, EDL933, EDL933, EDL933, N89-O541, EDL933, EDL933, EcL6611, EcL6611, respectivamente. As temperaturas de anelamento utilizadas foram 56 °C, 52 °C, 53 °C, 53 °C, 39 °C, 49 °C, 59 °C, 55 °C, 50 °C e 51 °C, respectivamente, para a PCR duplex de *bfp* e *astA*, e simples para *iha*, *toxB*, *saa*, *lpfAO113*, *lpfAO157/OI-141*, *lpfAO157/OI-154*, *ehxA*, *efa1* e *paa*. Demais dados dos “primers” estão detalhados na Tabela 3. Os produtos amplificados foram visualizados conforme descrito no item 4.4.1.

## 5.6 Subtipagem do gene *stx2*

A subtipagem do gene *stx2* no presente trabalho foi baseada no novo protocolo desenvolvido por Scheutz et al. (2012). Esta nova técnica consiste em determinar as 7 variantes do gene *stx2*, sendo elas *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* e *stx2g*, utilizando como controles positivos as cepas STEC 94-C, EH250, 031, C165-02, S1191, T4/97 e 7v, respectivamente. A técnica é realizada através de PCR com volume total de 20µL, contendo 2,5µL de água, 10µL Hotstar Taq Master Mix Kit (QIAGEN), 1,25µL de cada um dos 2 primers (concentração de 5 mM) e 5µL do DNA. As condições do termociclador foram 95°C por 15 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 62°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos; finalizando com 72°C por 3 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados conforme descrito no item 4.4.1 e os dados dos “primers” estão descritos na Tabela 3.

## 5.7 Testes bioquímicos

Todos os isolados foram submetidos a uma bateria de provas bioquímicas de acordo com Mac Faddin (1976) e testados para a fermentação da lactose, produção de indol, reações vermelho de metila e” Voges-Proskauer, utilização de citrato,

produção de urease e semeados em ágar “Triple Sugar Iron” (TSI, Oxoid – Inglaterra).

### 5.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para a realização desse teste, a estirpe isolada foi repicada em tubo contendo 3 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C até atingir o padrão 0,5 de MacFarland. Após a incubação, a cultura foi semeada com o auxílio de “swab” estéril em placa contendo ágar “Mueller-Hinton” (MH, Himedia – Índia) e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio de cultura, foram colocados os discos contendo os antimicrobianos.

Os antimicrobianos testados foram selecionados pela utilização na piscicultura e importância na disseminação de genes de resistência, sendo eles: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina, (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), nitrofurantoína (300µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25µg), ácido nalidíxico (30µg), ceftiofur (30µg), cefoxitina (30µg), kanamicina (30µg), norfloxacina (10µg) e enrofloxacina (5µg). Os diâmetros foram comparados com o guia CLSI (2009).

### 5.9 Agrupamento Filogenético

O agrupamento filogenético foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Clermont et al. (2000). Essa metodologia é baseada na identificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *tspE4C2* e posterior análise da árvore dicotômica (Figura 4) para classificação de cada grupo de acordo com a presença ou ausência dos genes avaliados.

A detecção dos genes foi feita através de PCR em que cada reação de amplificação foi conduzida em volume de 25µL contendo 5µL de DNA; 2,5 mL de solução de dNTPs (2mM); 1,25µL de cada iniciador a 10µM ; 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL); 2,5µL de solução tampão para a reação de PCR com MgCl<sub>2</sub> (10X) e 7,3µL de água Milli-Q estéril. Esta mistura foi submetida a um termociclador a 94°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. O último ciclo foi realizado a 72 °C

por 10 minutos para completa extensão da Taq DNA polimerase.

Os produtos amplificados foram visualizados conforme descrito no item 4.4.1 e os dados dos “primers” utilizados estão detalhados na Tabela 3.

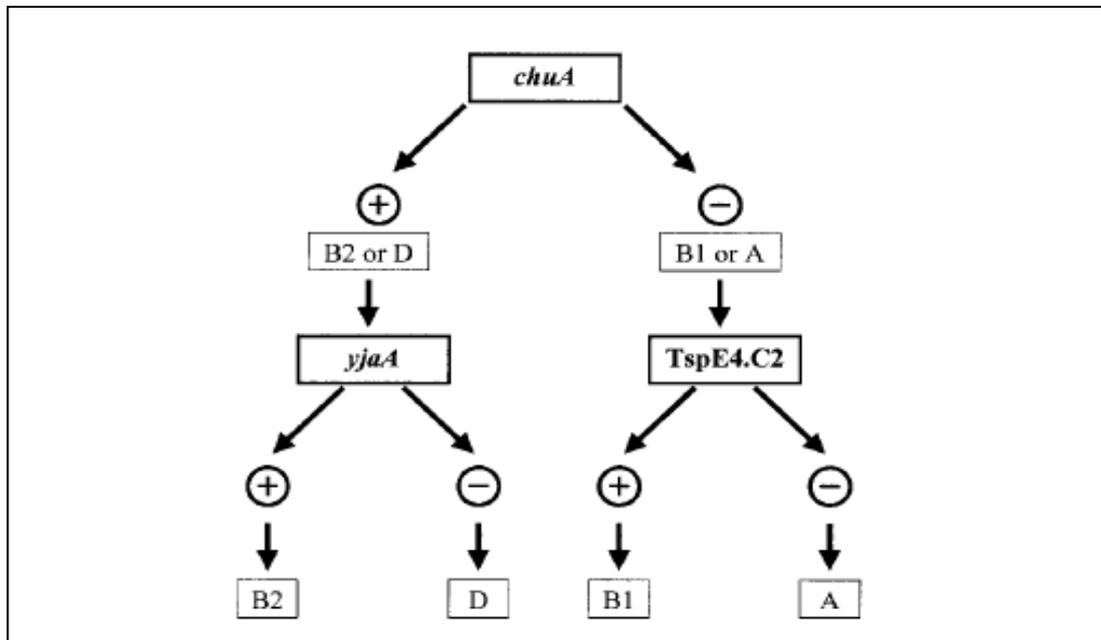


Figura 4. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético dos isolados desenvolvida por Clermont et al. (2000).

### 5.10 Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada através de aglutinação em placas de acordo com o procedimento publicado por Orskov et al. (1977), para determinar o sorogrupo O; e através de PCR-RFLP pelo método descrito por Machado et al. (2000), para determinar o sorogrupo H. Os antíseros foram provenientes do *E. coli* Reference Center (EcRc) da Universidade Estadual da Pensilvânia, com especificidade para os antígenos somáticos O1 ao O187, exceto O31, O47, O67, O72, O94, O122; enquanto que os antígenos flagelares pesquisados H1 ao H49, exceto H17.

### 5.11 Análise de diversidade genética por PFGE

Os isolados foram caracterizados pelo protocolo padrão de PFGE da PulseNet, conforme descrito por Ribot et al. (2006) com pequenas modificações. O

sistema utilizado foi o CHEF DR-III (Bio-Rad, EUA), o DNA cromossomal foi digerido com a enzima XbaI (Invitrogen, EUA) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose Pulsifield Certified 1% (Bio-Rad, EUA), com voltagem de  $6V\text{ cm}^{-1}$ , em um ângulo de  $120^\circ$ , com tempo inicial de mudança de polaridade de 2.2 segundos e tempo final de mudança de polaridade de 54.2 segundos. A estirpe *Salmonella* Braenderup (H9812) foi utilizada como padrão e os géis foram submetidos à eletroforese por 21h a uma temperatura de  $14^\circ\text{C}$ . As semelhanças de fragmentos foram comparadas utilizando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização. O dendrograma foi calculado com o método de agrupamento UPGMA, utilizando o Software BioNumerics, versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

## **5.12 Análise de diversidade genética por rep-PCR**

### **5.12.1 Extração de DNA genômico**

Para realizar as análises de diversidade genética por rep-PCR, foi preciso que o DNA estivesse íntegro e por isso, não pode ser utilizado o DNA extraído por fervura utilizado nas etapas anteriores.

Para extrair o DNA genômico, as cepas de *E. coli* foram multiplicadas em caldo BHI. Para extração de DNA o “pellet” de células bacterianas foi lavado com tampão PBS (8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) e logo após ressuspenso em 600  $\mu\text{L}$  de tampão para extração de DNA [Tris-HCl 100mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, NaCl 100mM e SDS 0,5%]. As amostras foram agitadas em vortex e mantidas em banho-maria a  $65^\circ\text{C}$  por 40 minutos, sendo agitadas a cada 15 minutos, levemente. Posteriormente, foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio 5M à solução que será misturada levemente por inversão e mantida no gelo por 30 minutos. Após, foi adicionado às amostras 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação em vortex. Para separação das fases e limpeza do DNA, as amostras foram centrifugadas a  $13.400 \times g$  por 10 minutos a  $10^\circ\text{C}$ . Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos, cuidadosamente para não tocar na interface inferior. Visando a precipitação

do DNA, foi adicionado 1000 µL de etanol absoluto gelado ao sobrenadante coletado e a solução, após ser misturada gentilmente, foi mantida em freezer -20°C por 18h.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 13.400 x g por 17 minutos a 10°C. A fase líquida foi descartada e o “pellet” lavado com 1000 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o “pellet” colocado para secar em temperatura ambiente, ±25°C, por 60 minutos. Posteriormente, o “pellet” foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0).

A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Thermo Scientific, EUA), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que estando no intervalo de 1,8 a 2,0 é considerado um DNA de boa qualidade (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **5.12.2 rep-PCR (REP, ERIC e BOX)**

Para análise da diversidade genética entre os microrganismos selecionados foi empregada a técnica rep-PCR, que consiste na utilização dos dados concatenados de REP-PCR (“Repetitive Extragenic Palindromic”), ERIC-PCR (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) e BOX-PCR. Para tal, foram utilizados os primers: Rep1R-I (5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3') e Rep2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'), ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') e BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC et al., 1994).

Para a reação PCR de amplificação dos fragmentos, foi utilizado o tampão 1X [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40]; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 5 pmol de primer, 60 ng de DNA genômico e água ultrapura estéril até atingir 20 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 1 minutos a 40°C para REP-PCR, 50°C para ERIC-PCR e 55°C para BOX-PCR, e 72°C por 1,5 minuto. Para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%,

contendo brometo de etídio (1,0 µg/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder. Assim, os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação, conforme descrito no item 4.4.1.

A análise dos dados através da similaridade dos fragmentos foi comparada pelo coeficiente de Person, que calcula a média de todas as matrizes (REP, ERIC e BOX) concatenadamente, e o dendrograma foi construído com o método de agrupamento UPGMA, utilizando o programa BioNumerics, versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

Tabela 3. Lista de “primers” e condições das reações usadas nas PCRs

Primers	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Tamanho Fragmento (pb)	Temperatura Anelamento (°C)	Referência
<i>stx1-F</i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388	50	China et al. (1996)
<i>stx1-R</i>	TTGCCCCCAGAGTGGATG			
<i>stx2-F</i>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807	50	China et al. (1996)
<i>stx2-R</i>	GACATTCTGGTTGACTCTCTT			
<i>eae -F</i>	AGGCTTCGTACAGTTG	570	50	China et al. (1996)
<i>eae -R</i>	CCATCGTCACCAGAGGA			
<i>bfp - F</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGTAT	300	56	Vidal et al. (2004)
<i>bfp -R</i>	GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT			
<i>ehxA -F</i>	GGTGCAGCAGAAAAGTTGTA G	340	55	Toma et al. (2004)
<i>ehxA -R</i>	TCTCGCCTGATAGTGTGGT A			
<i>saa- F</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	53	Paton e Paton (2002)
<i>saa -R</i>	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>iha -F</i>	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC	1305	52	Schmidt et al. (2001b)
<i>iha -R</i>	GTATGGCTCTGATGCGATG			
<i>toxB -F</i>	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	602	53	Tarr et al. (2002)
<i>toxB -R</i>	TTCTTACCTGATCTGATGCAGC			

<i>efa1</i> -F	GAGACTGCCAGAGAAAG	479	50	Nicholls et al. (2000)
<i>efa1</i> -R	GGTATTGTTGCATGTTTCAG			
<i>lpfA</i> <sub>O113</sub> -F	ATGAAGCGTAATAATTATAG	573	39	Doughty et al. (2002)
<i>lpfA</i> <sub>O113</sub> -R	TTATTTCTTATATTCGAC			
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-141</sub> -F	CTGCGCATTGCCGTAAAC	412	49	Szalo et al. (2002)
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-141</sub> -R	ATTTACAGGCGAGATCGTG			
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-154</sub> -F	GCAGGTCACCTACAGGCGGGC	525	59	Toma et al. (2004)
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-154</sub> -R	CTGCGAGTCGGGTTAGCTG			
<i>astA</i> -F	TCGGATGCCATCAACACAGT	125	56	Ngeleka et al. (2003)
<i>astA</i> -R	GTCGCGAGTGACGGCCTTTGTAG			
<i>paa</i> -F	ATGAGGAACATAATGGCAGG	360	51	Savarino et al. (1993)
<i>paa</i> -R	TCTGGTCAGGTCGTCAATAC			
<i>stx2a</i> -F	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	347	62	Scheutz et al. (2012)
<i>stx2a</i> -R	GCCACCTTCACTGTGAATGTG			
<i>stx2b</i> -F	AAATATGAAGAAGATAATTTGTAGCGGC	251	62	Scheutz et al. (2012)
<i>stx2b</i> -R	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>stx2c</i> -F	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	177	62	Scheutz et al. (2012)
<i>stx2c</i> -R	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA			
<i>stx2d</i> -F	AAARTCACAGCTTTTATATACAACGGGTG	179	62	Scheutz et al. (2012)
<i>stx2d</i> -R	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG			

stx2e-F	CGGAGTTACGGGGGAGAGGC	411	62	Scheutz et al. (2012)
stx2e-R	CTTCCTGACACACCTTCACAGTAAAGGT			
stx2f-F	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	424	62	Scheutz et al. (2012)
stx2f-R	TAATGGCCCGCCCTGTCTCC			
stx2g-F	CACCGGTTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573	62	Scheutz et al. (2012)
stx2g-R	GATGGCAATTCAGAAATAACCGCT			
ChuA -F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55	Clermont et al. (2000)
ChuA -R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
YjaA -F	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211	55	Clermont et al. (2000)
YjaA -R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TspE4C2-F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	55	Clermont et al. (2000)
TspE4C2-R	CGCGCCAACAAGTATTACG			

## 6 Resultados

### 6.1 Detecção de STEC e EPEC

Das 373 amostras de peixes de piscicultura analisadas, uma (0,26%) apresentou positividade para um dos genes relacionados à STEC (amostra 125F5). O gene encontrado foi o *stx2*, e a amostra era proveniente de fezes de um animal de piscicultura. Das 99 amostras de peixes de vida livre analisadas, seis (6,06%) foram positivas para ao menos um dos genes relacionados à STEC ou EPEC (amostras 6F8, 9F8, 10F8, 12F8, 24F8 e 30F8), e todas oriundas de um mesmo estabelecimento, sendo observada a presença de *stx1*, *stx2* e *eae*, o perfil patogênico de cada amostra positiva está detalhado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil genético associado aos patótipos de STEC e EPEC em fezes de peixes

Genes	Amostras						
	125F5 <sup>a</sup>	6F8 <sup>b</sup>	9F8	10F8	12F8	24F8	30F8
<i>stx 1</i>			+			+	
<i>stx 2</i>	+	+	+		+		+
<i>eae</i>				+		+	

<sup>a</sup> F5 - amostra fecal de animal de piscicultura

<sup>b</sup> F8 - amostra fecal de animal de vida livre

### 6.2 Detecção de outros genes de virulência

O isolado proveniente de piscicultura foi positivo para os genes de virulência *ehxA*, *lpfA<sub>0113</sub>* e *saa*, e as estirpes isoladas de animais de vida livre apresentaram os genes *astA*, *ehxA*, *lpfA<sub>0113</sub>*, *saa*, *efa1* e *paa*. Cada isolado apresentou um perfil de virulência, conforme detalhado na Tabela 5. O gene *lpfA<sub>0113</sub>* foi detectado em todos os isolados e a estirpe EPEC (amostra 10F8) não apresentou o gene *bfp*, sendo portanto, uma EPEC atípica.

Tabela 5. Perfil de virulência dos isolados de STEC e EPECa em fezes de peixes

Genes de virulência	Isolados						
	125F5 <sup>a</sup>	6F8 <sup>b</sup>	9F8	10F8	12F8	24F8	30F8
<i>bfp</i>							
<i>ehxA</i>	+				+	+	
<i>saa</i>	+				+		
<i>iha</i>							
<i>toxB</i>							
<i>efa1</i>						+	
<i>lpfA</i> <sub>O113</sub>	+	+	+	+	+	+	+
<i>lpfA</i> <sub>O157/O141</sub>							
<i>lpfA</i> <sub>O157/O154</sub>							
<i>astA</i>							+
<i>paa</i>						+	

<sup>a</sup> F5 - amostra fecal de animal de piscicultura

<sup>b</sup> F8 - amostra fecal de animal de vida livre

### 6.3 Subtipagem do gene *stx2*

Em relação às variantes da toxina Stx2, foi observada a rara combinação dos subtipos *stx2a*, *stx2c* e *stx2d* em um mesmo isolado. Um dos isolados não foi tipável para nenhuma das variantes testadas. Os subtipos de cada isolado estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Prevalência dos subtipos do gene *stx2* dos isolados STEC em fezes de peixes

Isolados	<i>stx2</i>						
	a	b	c	d	e	f	g
125F5	+		+	+			
6F8	+			+			
9F8	+						
12F8	+			+			
30F8							

## 6.4 Testes bioquímicos

Todos os isolados de STEC e EPECa demonstraram reações bioquímicas padrões para a espécie *E. coli*, conforme detalhado na Tabela 7, e os isolados semeados no ágar TSI também apresentaram características típicas de *E. coli*: base e ápice amarelos com formação de gás.

Tabela 7. Características bioquímicas dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes

Testes	Isolados						
	125F5 <sup>c</sup>	6F8 <sup>d</sup>	9F8	10F8	12F8	24F8	30F8
Indol	+	+	+	+	+	+	+
VM <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+
VP <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> VM - Vermelho de Metila

<sup>b</sup> VP - Voges-Proskauer

<sup>c</sup> F5 - amostra fecal de animal de piscicultura

<sup>d</sup> F8 - amostra fecal de animal de vida livre

## 6.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A estirpe STEC proveniente de piscicultura apresentou resistência a 13, dos 15 antimicrobianos testados. Dentre os isolados de peixe de vida livre, o isolado que apresentou maior resistência, foi resistente a três antimicrobianos. O perfil de resistência de cada isolado frente aos diversos antimicrobianos testados está descrito na Tabela 8.

Os isolados 9F8, 10F8 e 24F8 apresentaram nível intermediário de sensibilidade à tetraciclina, mas essa classificação é definida como resistência por alguns pesquisadores, pois não se deve administrar um medicamento com possibilidade de não atingir seu objetivo, que é eliminar o microrganismo patogênico. Portanto, padronizamos nossos resultados intermediários como sendo resistentes.

Tabela 8. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes

Antimicrobianos*	Isolados						
	125F5 <sup>c</sup>	6F8 <sup>d</sup>	9F8	10F8	12F8	24F8	30F8
AMP	R <sup>a</sup>	R	R	R	S	R	R
CFL	R	R	R	R	S	R	R
EST	R	S <sup>b</sup>	S	R	S	R	R
GEN	R	S	S	S	S	S	S
CIP	R	S	S	S	S	S	S
CLO	R	S	S	S	S	S	S
TET	R	S	R	R	S	R	S
NIT	R	S	S	S	S	S	S
NAL	R	S	S	S	S	S	S
SUT	S	S	S	S	S	S	S
CFO	S	S	S	S	S	S	S
CRO	R	S	S	S	S	S	S
KAN	R	S	S	R	S	R	S
NOR	R	S	S	S	S	S	S
ENO	R	S	S	S	S	S	S

\*AMP- Ampicilina, CFL- Cefalotina, EST- Estreptomicina, GEN- Gentamicina, CIP- Ciprofloxacina, CLO- Cloranfenicol, TET- Tetraciclina, NIT- Nitrofurantoína, NAL- Ácido Nalidíxico, SUT- Sulfametoxazol+trimetoprim; CFO- Cefoxitina, CRO - Ceftriaxona , KAN- Kanamicina, NOR- Norfloxacin e ENO-Enrofloxacin.

<sup>a</sup> R- Resistente

<sup>b</sup> S- Sensível

<sup>c</sup> F5 - amostra fecal de animal de piscicultura

<sup>d</sup> F8 - amostra fecal de animal de vida livre

## 6.6 Agrupamento Filogenético

Conforme a árvore dicotômica (Figura 4) desenvolvida por Clermont et al. (2000) para análise do agrupamento filogenético baseada na presença ou ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e *tspE4C2*, todos as estirpes STEC pertencem ao grupo B1, que tem como característica serem patogênicas isoladas de animais, e a estirpe EPECa, foi classificada no grupo A, que tem como características serem comensais.

## 6.7 Sorotipagem

Das sete amostras analisadas, três não foram tipáveis para o antígeno O e outras três amostras não foram tipáveis para o antígeno H foram identificados os sorogrupos O55, O39, O116, H14, H18 e H36. Os sorotipos encontrados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Perfil sorológico dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes.

Sorogrupos	Isolados						
	125F5	6F8	9F8	10F8	12F8	24F8	30F8
O	NT*	O55	O39	NT	O116	O116	NT
H	H18	NT	H14	H36	H36	NT	NT

\* NT – não tipável

## 6.8 PFGE

Os sete isolados analisados apresentaram perfis heterogêneos por PFGE. Nenhum isolado apresentou mais de 70% de similaridade, conforme ilustrado na Figura 5, e mesmo isolados com o mesmo sorogrupo (O116) e com perfis de virulência idênticos (12F8 e 125F5), foram distintos na análise por PFGE.

## 6.9 rep-PCR

Os isolados 24F8 e 30F8 apresentaram 90% de similaridade, os isolados 12F8 e 125F5 apresentaram 80% de similaridade. Os demais isolados apresentaram perfis heterogêneos, com 70% ou menos de similaridade. Os géis das análises de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR isoladamente podem ser observados nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente. O dendrograma da rep-PCR está ilustrado da Figura 9.

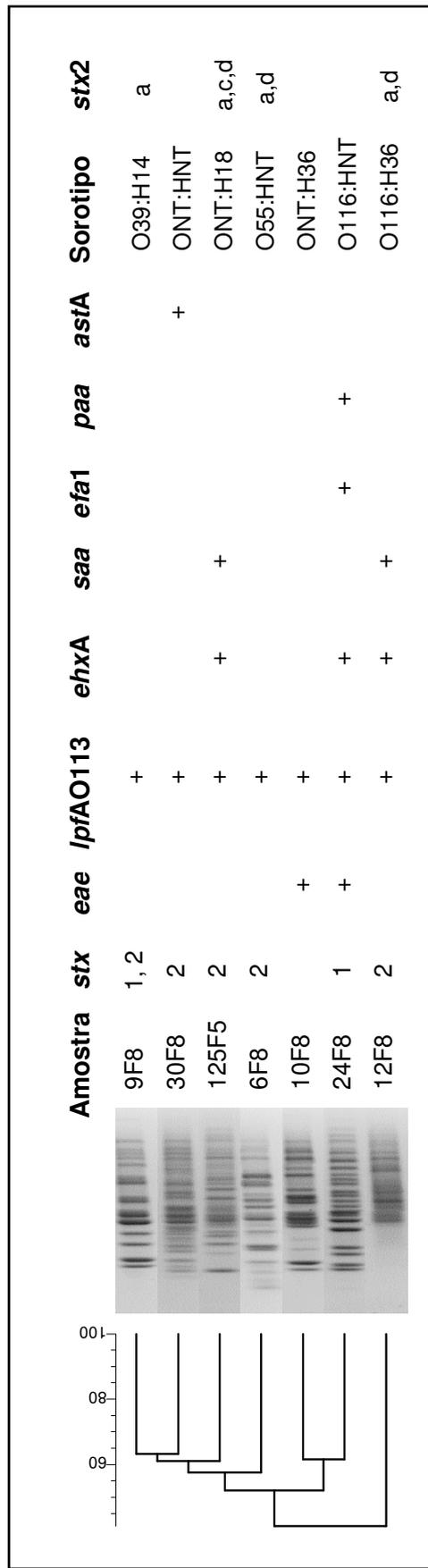


Figura 5. Associação entre o dendrograma da análise de diversidade genética por PFGE e indicadores de virulência dos isolados STEC e EPECa de peixes

- NT – não tipável
- F5 - amostra fecal de animal de piscicultura
- F8 - amostra fecal de animal de vida livre

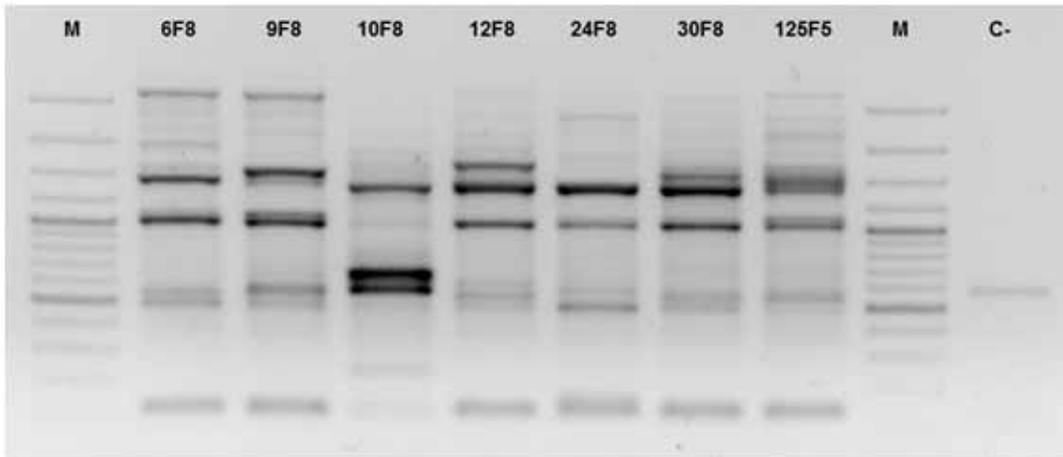


Figura 6. Gel referente a análise de diversidade genética por REP-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes

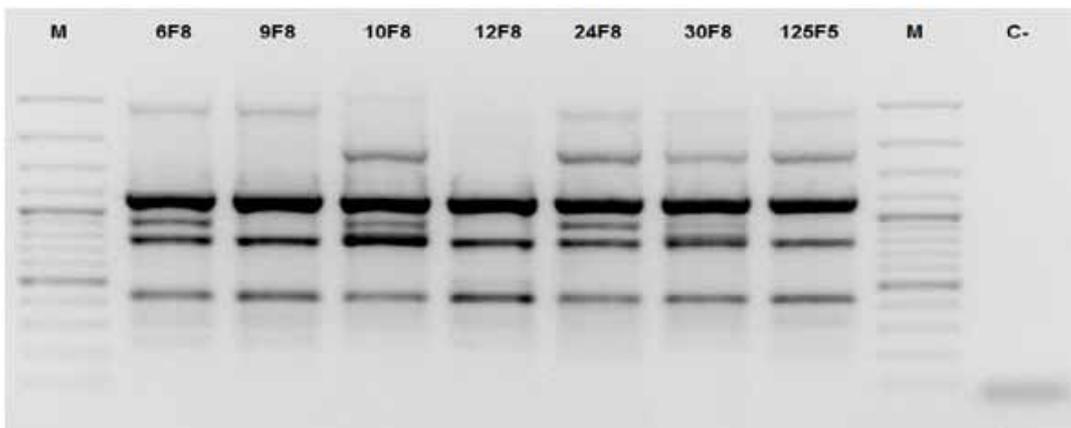


Figura 7. Gel referente a análise de diversidade genética por ERIC-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes

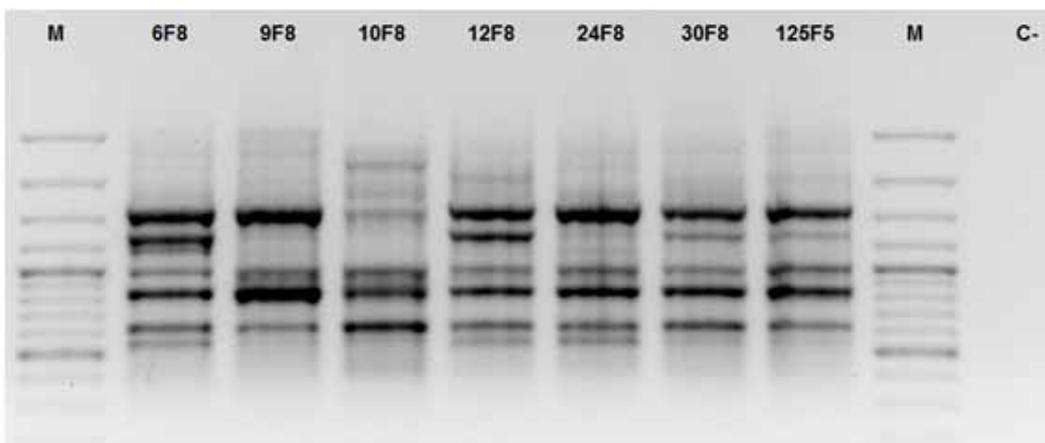


Figura 8. Gel referente a análise de diversidade genética por BOX-PCR dos isolados STEC e EPECa em fezes de peixes

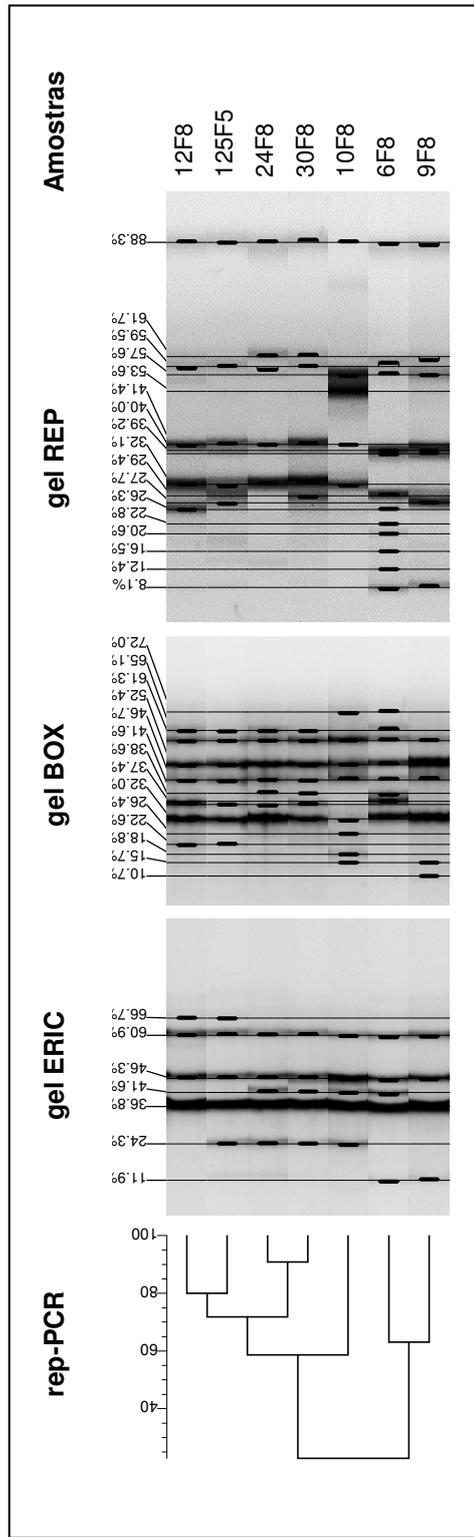


Figura 9. Dendrograma representando a diversidade genética dos isolados STEC e EPECa de peixes realizada por rep-PCR

## 7 DISCUSSÃO

Linhagens STEC albergam a toxina Stx e também podem apresentar a ilha de patogenicidade LEE, que codifica proteínas homólogas àquelas produzidas por EPEC, apresentando portanto o gene *eae*. Este fato fez com que alguns autores utilizem o termo STEC ou VTEC para qualquer cepa de *E. coli* produtora de Stx, e EHEC para linhagens Stx-positivos que apresentem o gene *eae* (KAPER et al., 2004). Entretanto, isto não é universal, e neste estudo utilizaremos sempre o termo STEC para designar linhagens que apresentem *stx*, independente da presença de *eae*.

No presente trabalho, foram isoladas estirpes STEC e EPEC em fezes de peixes, evidenciando que, embora não seja um habitante natural da microbiota desses animais, *E. coli* pode colonizá-los através da contaminação da água em que esses animais vivem (GUZMÁN et al., 2004). Segundo Muratori et al. (2004), a microbiota de peixes recém capturados reflete o ambiente terrestre próximo aos ambientes hídricos e a contaminação da água em sistemas pesqueiros pode ocorrer pela entrada direta de fezes advindas de animais das proximidades (MORITA et al., 2006). Nos dois estabelecimentos em que foram isoladas as estirpes neste estudo, bovinos eram criados ao redor dos locais de captura, e estes animais são considerados os principais reservatórios de *E. coli* patogênicas (MEICHTRI et al., 2004).

Para evidenciar esta informação, diversos trabalhos apontam elevada prevalência de STEC em bovinos em todo o mundo. Nos Estados Unidos, a frequência de STEC em gado saudável alcançou 20% dos animais (MAINIL; DAUBE, 2005). Na Espanha, STEC foi isolada em 37% dos bezerros e em 35% dos bovinos adultos investigados (BLANCO et al., 1997). No Brasil, a prevalência observada em estudo no Rio de Janeiro foi de 65% (TRISTÃO et al., 2007), enquanto no Estado de São Paulo, Leomil et al. (2003) observaram a ocorrência de genes *stx* em 20% dos bezerros diarreicos em fazendas de gados de corte. No sul do país, estudos apontaram uma prevalência de 36% no Paraná (PIGATTO et al., 2008) e 49% no Rio Grande do Sul (MOREIRA et al., 2003). Na região centro oeste, Salvadori et al. (2003) detectaram STEC em 16.1% de bezerros diarreicos. Todos esses resultados evidenciam o importante papel dos bovinos em albergar *E. coli*

diarreiogênicas, e os autores descrevem ainda que, essas linhagens são isoladas com frequência de animais saudáveis, pois são portadores assintomáticos.

Com relação a água, apesar de possivelmente ter veiculado a transmissão do patógeno entre os bovinos aos peixes neste estudo, nenhuma amostra de água foi positiva para STEC ou EPEC, fato que pode ser justificado pelo elevado fluxo de água existente tanto nos viveiros, pois é ítem obrigatório de boas práticas de manejo, quanto nos rios. Nosso resultado difere do encontrado por Müller et al. (2001), pois os autores detectaram STEC em rios da África do Sul, cujas águas são destinadas ao consumo direto e indireto de seres humanos. Embora surtos de infecção por STEC estejam altamente associados aos ruminantes, outros surtos através da transmissão da água já foram registrados (FELDMAN et al., 2002; OLSEN et al., 2002), indicando que o patógeno pode contaminar as águas superficiais e subterrâneas e então, infectar o homem. Nesses trabalhos, os autores apontam as fezes de bovinos como fonte de contaminação mais provável da água.

Confirmando esse fato, em trabalho realizado em Minnesota com *E. coli* em peixes bentônicos e pelágicos, foi encontrado 42% de positividade nos peixes bentônicos e 4% nos pelágicos. Os autores observaram ainda que, as *E. coli* isoladas dos peixes eram idênticas as de animais endotérmicos da região, evidenciando que o peixe foi infectado através da água contaminada com fezes desses animais (HANSEN et al., 2008). Sabendo que a água pode veicular o patógeno, deve-se aumentar os cuidados relacionados a criação de peixes e a presença de animais com potencial fonte de infecção desses patógenos para seres humanos. Pois, além dos bovinos, diversos outros animais foram observados como reservatórios de STEC e EPEC, tais como: ovinos (VETTORATO et al., 2003, MALUTA et al., 2013), suínos (SÁNCHEZ et al., 2010, BORGES et al., 2012), bubalinos (ISLAM et al., 2008, BERALDO et al., 2014) e macacos (CARVALHO et al., 2003).

Ainda sobre a presença de animais ao redor de criações de peixes, é importante mencionar sobre a prática de consórcios, na qual os resíduos de animais atuam como fonte de insumos aos peixes. Os consórcios são frequentes em alguns estados brasileiros, principalmente no sul do país, sendo que os tipos mais comuns são aqueles formados por cultivos de peixes e aves ou peixes e suínos. Na produção integrada com suínos, os dejetos são escoados diretamente para dentro dos viveiros, que muitas vezes são construídos sob os compartimentos dos peixes,

com a intenção de redução de custos (OLIVEIRA, 2009). E diversos são os estudos que apontam a presença de STEC e EPEC em suínos (CHAPMAN et al., 2006, SÁNCHEZ et al., 2010, BORGES et al., 2012), o que coloca em risco a saúde dos consumidores dos peixes em questão.

No presente estudo, nenhuma amostra da musculatura dos peixes foi positiva para presença de STEC ou EPEC. Esse resultado não minimiza o problema, pois as amostras foram colhidas em condições asépticas e através da dissecação do animal, para que as amostras de musculatura fossem cuidadosamente separada das amostras de fezes, fato que não ocorre no cotidiano de pescadores ou abatedouros. Comumente, é feito um corte longitudinal entre o ânus e a cabeça do peixe, liberando todo o conteúdo intestinal e contaminando a musculatura com o patógeno. E como qualquer fonte de proteína de origem animal, os peixes podem ser via de transmissão de microrganismos patogênicos e intoxicações aos seres humanos consumidores. De acordo com Paton e Paton (1998), linhagens de *E. coli* patogênicas podem entrar na cadeia alimentar humana de várias maneiras, mas é frequentemente através da contaminação cruzada ou contaminação direta de alimentos, exatamente o fato que ocorre frequentemente no abate dos peixes.

A contaminação direta de peixes para consumo é um grande problema, pois assim como nesse trabalho, outros estudos confirmam que esses animais albergam *E. coli* patogênicas. Na Índia, analisando STEC em peixes e frutos do mar, 3% das amostras de peixe fresco foram positivas para esta estirpe (KUMAR et al., 2001). Manna et al. (2008) também na Índia, constataram prevalência semelhante ao encontrado no presente estudo, os resultados mostraram que 7,7% das carpas indianas albergavam *E. coli* sorbitol negativas pertencentes ao sorogrupo O105 e expressaram hemolisina de STEC. Na revisão realizada, foi observado que alguns estudos encontraram *E. coli* em peixes, mas são poucos os trabalhos que analisaram as linhagens STEC deste patógeno. E, dentre eles, nenhum avaliou a presença de linhagens EPEC ou determinou a presença de adesinas putativas.

Nesse trabalho, a menor prevalência de isolados obtidos em peixes de piscicultura pode ser justificada pela utilização de antimicrobianos, que é frequente em sistemas de criação intensiva. Embora não existam dados oficiais mostrando prejuízos econômicos advindos de enfermidades em pisciculturas comerciais, os patógenos são realidade e se tornam ameaças concretas à medida que o setor se expande e os sistemas aquícolas se intensificam (LIMA, 2004). O estresse do animal

frente a densidades populacionais elevadas, e a falta de boas práticas de manejo, prejudicam a produtividade e são fatores determinantes no surgimento de infecções bacterianas (OLIVEIRA, 2009). As bacterioses são limitadores da produtividade aquícola, pois causam grandes perdas econômicas e atraso no crescimento dos peixes de cultivo. Na tentativa de diminuir os prejuízos gerados, a literatura indica que diversos antimicrobianos são utilizados indiscriminadamente como preventivos na aquicultura (MAXIMIANO et al., 2005; GASKINS et al., 2002). De acordo com Pereira et al., (2006), a oxitetraciclina é amplamente utilizada em pisciculturas no Brasil, e os autores afirmam que este antimicrobiano é utilizado em tratamentos para infecções bacterianas, bem como para fins profiláticos.

Assim como no presente estudo, a multirresistência bacteriana aos antimicrobianos de isolados de peixes foi observada em diversos estudos. Na Dinamarca, 69% dos isolados de *Aeromonas* provenientes de peixes, água e sedimento, foram resistentes a oxitetraciclina (OTC) e, 48% apresentaram multirresistência. Além disso, a resistência a amoxicilina pareceu ser intrínseca na maioria das estirpes analisadas. Os autores concluem que, embora *Aeromonas* não são comumente associadas à doenças humanas, a ampla resistência aos antimicrobianos dentro este grupo pode ser transferida para outras espécies bacterianas presentes na água ou nos peixes através da disseminação horizontal de genes (SCHMIDT et al., 2001a). Akinbowale et al., (2007) encontraram que 70% dos isolados de várias espécies bacterianas provenientes de animais produzidos em diversas formas de aquicultura na Austrália, albergavam ampla variedade de genes de resistência à tetraciclina. Os autores também observaram a capacidade da transferência dos plasmídeos desses isolados resistentes a antimicrobianos para *E. coli* de aves, suínos e humanos.

Ainda sobre a utilização de antimicrobianos, os mais utilizados na piscicultura, são aqueles pertencentes às classes das quinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos e anfenicóis (RIGOS; TROISI, 2005), e isso justifica a multirresistência observada no isolado proveniente de piscicultura do presente estudo, pois todos os quimioterápicos testados pertencentes à classe das quinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos e anfenicóis, mostraram-se ineficientes para eliminar a estirpe do ambiente de criação intensiva. De acordo com Schmidt et al., (2000), os padrões de resistência bacterianas em patógenos de peixes são reflexo do uso intensivo de substâncias antimicrobianas em pisciculturas. Os

isolados de *E. coli* são cada vez mais resistentes a maioria dos antibióticos, incluindo a ampicilina, quinolonas, aminoglicosídeos, e cefalosporinas de terceira geração (EARSS, 2008). Segundo Gonzalez (2002), o surgimento de casos de resistência antimicrobiana bacteriana é um grande entrave na aquicultura atualmente, que coloca em risco a saúde pública justamente pela transferência dos genes de resistência.

Os testes bioquímicos deste trabalho foram realizados para eliminar possíveis resultados de STEC ou EPEC falso positivos nas PCRs, uma vez que a triagem foi realizada diretamente da cultura em BHI contendo a maioria da microbiota do animal. Nosso trabalho constatou que as características bioquímicas das linhagens patogênicas obtidas foram idênticas às da espécie *E. coli*. De acordo com Nataro e Kaper (1998), devido à semelhança bioquímica entre as diferentes estirpes, a identificação e classificação de linhagens patogênicas devem ser baseadas na presença de fatores de virulência associados a cada categoria, detectáveis através de métodos moleculares.

O resultado observado de um patótipo STEC com presença de *eae* encontrados neste trabalho, já foi relacionado à diarreias mais severas e SHU em trabalhos anteriores (PATON; PATON,1998, WERBER et al., 2003). Inclusive, este perfil de patótipo já foi associado com a presença de alguns genes de virulência igualmente encontrados neste trabalho, tais como *efa1* (NARIMATSU et al., 2010), *ehxA*, *lpfAO113*, e *paa* (AFSET et al., 2006). A presença de tais genes é relacionada com casos de diarreia graves, mostrando a importância zoonótica dessa estirpe se ingerida por consumidores desses alimentos (MALUTA et al., 2013).

Nesse contexto, esse trabalho encontrou outras características já observadas em trabalhos anteriores. O gene *saa* foi encontrado exclusivamente em cepas STEC *eae* negativa, e uma correlação entre a presença de *saa* e *ehxA* genes foi já demonstrado (CERGOLE-NOVELLA et al., 2007). Paton e Paton (2005) também observaram que a presença de *saa* estava intimamente relacionada com a presença de *ehxA* em estirpes STEC desprovidas de *eae* independentemente do sorotipo. Da mesma forma, o patótipo *stx1* e *eae* positivos com presença de *ehxA* foi o mais frequentemente encontrado em trabalho realizado no Brasil com bovinos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007). Os autores também evidenciaram que o gene *saa* é freqüentemente observado em STEC isoladas de bovinos e também é altamente associados ao patótipo *eae* negativo com presença de *ehxA*. Esses resultados estão

de acordo com os encontrados no presente estudo, aumentando as evidências de que os bovinos foram as prováveis fontes de infecção dos peixes através da contaminação da água onde os peixes vivem ou são criados.

Ainda sobre genes de virulência, assim como no presente estudo, Manna et al. (2008), também observaram estirpes com o patótipo *stx2* associado com a presença da enterohemolisina *ehxA*, evidenciando que tais perfis de virulência podem constituir um risco para a saúde pública pelo casos associados a diarreia em seres humanos. Em um isolado STEC neste trabalho, foi observada a presença do gene *astA*, que é considerado de grande importância na patogênese da diarreia em seres humanos, desempenhando fundamental papel na virulência dessa estirpe (AFSET et al., 2006, NGELEKA et al., 2003). Em relação a presença do gene *lpfAO113*, relatos anteriores já demonstraram uma alta prevalência em STEC isoladas de diferentes espécies animais (TOMA et al., 2004; CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; WU et al., 2007).

Também foi isolada no presente estudo uma estirpe EPEC sem a presença do gene *bfp*, classificada como EPEC atípica (EPECa). EPECa apresenta a região LEE e demais fatores de virulência, e já foram associadas a diversos surtos ocasionados pela ingestão de alimentos e água contaminados na Finlândia, Estados Unidos e Japão (VILJANEN et al., 1990; HEDBERG et al., 1997; YATSUYANAGI et al., 2003). Além desses surtos, diversos trabalhos apontam casos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento causados por infecção desse patógeno, e frequentemente a prevalência de EPECa é maior do que EPEC típicas (AFSET et al., 2004; NGUYEN et al., 2006; MORENO et al., 2010).

Com respeito aos surtos alimentares, em 2006, nos Estados Unidos, um surto por *E. coli* O157:H7 afetou 200 pessoas em 26 estados do país através do consumo de espinafre contaminado com o patógeno (CDC, 2007). A presença de suínos e bovinos gados em torno da plantação de espinafre, e a proximidade das fezes desses animais com a água e poços utilizados para irrigação foram identificados como potencial fator de contaminação ambiental. Em maio de 2011, as autoridades de saúde pública na Europa investigavam um surto causado por um híbrido STEC-EAEC do sorotipo O104: H4. De acordo com o relatório do Robert Kock Institute (2011), o surto envolveu 855 casos de SHU, 2.987 casos de gastroenterite aguda, causou 53 mortes e atingiu 16 diferentes países. A infecção foi causada pela ingestão de broto de vegetais contaminados provavelmente com fezes de animais.

Portanto, a contaminação ambiental de STEC, em terras de pastagens ou em águas de irrigação, justificam a detecção desses patógenos em produtos variados como legumes, verduras e frutas.

Baseado nessas informações, surtos por *E. coli* patogênicas podem apresentar grandes proporções e, embora surtos por STEC ou EPEC oriundas de peixes ainda não foram registrados, alimentos consumidos crus ou que não sejam suficientemente aquecidos são os principais veículos de infecção do patógeno aos seres humanos, e o aumento no consumo de peixe cru no Brasil e no mundo é preocupante, pois aumentam significativamente o risco de infecções.

Sobre os subtipos da Stx2, quatro, dos sete isolados do presente estudo apresentaram essa classe da toxina. E estudos indicam que as estirpes STEC que produzem a toxina Stx2 são mais associadas a doenças graves em seres humanos do que aquelas que produzem somente Stx1 ou Stx1 e Stx2 (OSTROFF et al., 1989). Uma provável justificativa para este fato é que o nível de transcrição do gene *stx2*, responsável por codificar a toxina Stx2, é maior que o do *stx1* (WEINSTEIN et al., 1988).

As variantes encontradas no presente trabalho foram classificadas de acordo com o novo sistema publicado por Scheutz et al. (2012) e considerando que esta metodologia é recente, não foi encontrado nenhum trabalho publicado para relatar e comparar com nossos resultados utilizando esse sistema de classificação. Por isso, serão utilizados relatos de artigos publicados baseados na classificação de Slanec et al. (2009). O subtipo *stx2a*, o qual apresentou maior prevalência no presente trabalho, seguido pelos subtipos *stx2d* e *stx2c*, foram resultados igualmente observados em estudo realizado nos Estados Unidos (FENG; REDDY, 2013). Estirpes produtoras dos subtipos *stx2a*, *stx2c*, ou *stx2d* são frequentemente associadas com o desenvolvimento de CH e SHU (SCHEUTZ et al., 2012), e a presença desses três subtipos combinados em um mesmo isolado, conforme observado neste trabalho, é muito incomum e faz com que esta estirpe apresente um importante agravante de virulência. É importante citar que, no presente estudo, um isolado não foi típico para nenhuma das 7 variantes testadas. Apesar de ser uma possibilidade remota, isso demonstra que esse isolado pode apresentar um subtipo totalmente diferente do que já foi descrito até o momento, pois os “primers” foram desenhados para detectar as variantes já cadastradas no banco de dados “GenBank”.

Com relação às análises filogenéticas, as cepas de *E. coli* são classificadas em quatro grupos principais de acordo com a proximidade genética: A, B1, B2 e D. As estirpes comensais pertencem ao grupo A, estirpes patogênicas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo B2 e, em menor grau, para o grupo D, e o grupo B1 é constituído pelas estirpes intestinais patogênicas (CLERMONT et al., 2000, BARBIERI et al., 2013). Escobar-Páramo et al., (2004) observaram que populações de seres humanos que vivem em regiões tropicais abrigam preferencialmente cepas dos grupo A e B1, e estas estirpes apresentam uma base genética necessária para serem consideradas patógenos intestinais, sendo um dos fatores que explica a maior incidência de diarreia em humanos nos países tropicais. Além disso, isolados de peixes, anfíbios e répteis são geralmente classificadas nos grupos A ou B1 (GORDON; COWLING, 2003). Tendo em vista essas considerações, os resultados do presente estudo estão de acordo com as classificações encontradas.

Com relação aos sorogrupos de estirpes STEC, as denominadas não-O157 são mais prevalentes em animais e em alimentos, e por este motivo, os seres humanos estão mais expostos a infecções causadas por esses sorogrupos. Na Índia, terceiro maior produtor de pescado do mundo, STEC não-O157 têm sido frequentemente detectadas a partir de fezes de gado, crianças com diarreia e diversos alimentos, inclusive peixes. Diversos autores concluíram que os peixes apresentam más condições sanitárias naquele país (KUMAR et al., 2001; MANNA et al., 2008), evidenciando a importância dos demais sorogrupos para a saúde pública.

Baseado nisso, infecções causadas pelo sorogrupo O116, encontrado no presente estudo, são frequentemente associadas com doenças graves em humanos (BLANCO et al., 2004). O sorogrupo H18 na presença do gene *stx2* e ausência de *eae*, conforme encontrado neste trabalho, já foi descrito como uma associação frequente e relacionada a infecções em animais (EKLUND et al., 2001). O sorotipo ONT:H18 em estirpes *eae* negativas e *saa* positivas, semelhante ao encontrado neste estudo, já foi detectado em trabalhos analisando *E.coli* patogênicas em bovinos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007), reforçando a ideia de que esses animais foram as prováveis fontes de infecção do patógeno aos peixes.

Os resultados da análise de diversidade genética por PFGE demonstraram uma grande heterogeneidade entre os isolados. Apesar dos isolados obtidos pertencerem a uma mesma espécie bacteriana, a técnica de PFGE capta as características de todo o genoma bacteriano, demonstrando as diversidades

genéticas entre isolados de mesma espécie. Outros trabalhos envolvendo PFGE e estirpes STEC e EPEC em diversas espécies animais também mostraram grande heterogeneidade entre os isolados de um mesmo patótipo (AFSET et al., 2008, VETTORATO et al., 2009, MALUTA et al., 2013). Moura et al. (2009), em estudo envolvendo EPECa observaram uma heterogeneidade menor, entretanto, o trabalho envolveu estirpes pertencentes a um mesmo sorogrupo, o que pode justificar esse resultado.

Os resultados da análise de diversidade genética por rep-PCR demonstraram uma heterogeneidade entre os grupos formados e similaridade entre alguns isolados. Em trabalho realizado nos Estados Unidos, os autores utilizaram esta técnica para avaliar a diversidade genética de *E. coli* de diversas fontes, e observaram que os isolados foram agrupados de acordo com a origem dos isolados avaliados (CARSON et al., 2003). Em contrapartida, Oliveira et al (2007) relataram um baixo poder de discriminação da rep-PCR utilizada em amostras de *S. Enteritidis* isoladas de frangos, suínos, humanos e alimentos envolvidos em surtos no sul do Brasil. Os autores afirmaram que os agrupamentos não tiveram relação com o perfil de cada isolado. Este resultado foi semelhante ao presente estudo, pois apesar de todos os isolados serem de uma mesma fonte, foi observado que o grupo formado com 80% de similaridade apresentou relação com o perfil de virulência, mas o mesmo não aconteceu no grupo formado com 90% de similaridade, em que não foi observada relação entre perfil de virulência ou sorológica dos isolados.

Ainda em relação às duas análises de diversidade genética utilizadas no presente trabalho, PFGE e rep-PCR, os agrupamentos e porcentagens de similaridade observados nos isolados foram diferentes para cada uma das técnicas. Hahm et al. (2003), analisando diversidade genética de *E. coli* de origem alimentar e ambiental por PFGE e rep-PCR, observaram que os métodos não agruparam os isolados da mesma forma. Este resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho, o que demonstra que os métodos escolhidos detectam diferentes alvos genéticos. Além disso, ambas as técnicas não encontraram clones prevalentes nas *E. coli* de peixes, evidenciando que STEC e EPECa oriundas de peixes apresentam uma origem clonal diversificada.

## 8 CONCLUSÕES

- Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial papel dos peixes na transmissão de STEC e EPECa para os seres humanos;
- A presença de STEC e EPECa em peixes evidencia a possibilidade de que a água foi o veículo de transmissão dos patógenos a esses animais;
- Os peixes com amostras positivas para presença de STEC ou EPECa devem ser consideradas produtos em condições sanitárias insatisfatórias, de acordo o estabelecido pela legislação brasileira, pois segundo as normas vigentes, microrganismos patogênicos ou toxinas em produtos destinados ao consumo humano representam risco à saúde do consumidor;
- Os marcadores relacionados às adesinas putativas com potencial zoonótico detectadas demonstram que estes animais podem ser um risco potencial a saúde pública quando não submetidos às devidas condições higiênico-sanitárias em sua produção;
- A subtipagem de Stx2 apresentou variabilidade e uma incomum combinação de variantes da toxina que agrega um importante agravante na virulência dessa estirpe;
- O agrupamento filogenético estabeleceu que todas as STEC oriundas de peixes foram classificadas como patogênicas intestinais, e a EPECa como comensal;
- A sorotipagem evidenciou a presença de sorogrupos já relacionados a casos de diarreia em seres humanos;
- A elevada multirresistência da estirpe STEC proveniente de piscicultura sugere o uso indiscriminado de antimicrobianos e evidencia a possibilidade de disseminação de genes de resistência aos seres humanos;

- Ambas as análises de diversidade genética utilizadas, PFGE e rep-PCR, não encontraram clones entre qualquer isolado, caracterizando que as STEC e EPECa em peixes apresentam uma origem clonal diversificada. A análise de diversidade genética por PFGE revelou uma grande heterogeneidade entre os isolados STEC e EPEC, enquanto a rep-PCR mostrou semelhança entre alguns isolados.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M. O.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 397-406, 2008.

ACHESON, D. W. How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically. **Journal of Food Proteomic**, v. 63, p. 819-821, 2000.

ADAM, D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50 (Suppl. 1), p. 1-5, 2002.

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1137–1144, 2004.

AFSET, J.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3703-3711, 2006.

AFSET, J.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2280-2290, 2008.

AIDAR-UGRINOVKCH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 297-306, 2007.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, p. 2016-2025, 2007.

ALVES, A.; HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. **Tipagem Genética de Microrganismos**, Aveiro, p. 3-5, 2003.

ANVISA, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001**, 2001. 48 p.

ARANA, L. V. **Fundamentos de aqüicultura**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

ÁVILA, F. A.; RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. **Antibióticos, quimioterápicos e probiótico**. Funep, 1ed, Jaboticabal, SP, 5-6, 2011.

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P. M.; BARRETT, T. J.; GREENE, K. D.; BIBB, W. F.; GREEN, J. H.; WELLS, J. G. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 7, p. 1063-1070, 2001.

BARBIERI, N. L.; OLIVEIRA A. L.; TEJKOWSKI, T. M.; PAVANELO, D., B.; ROCHA, D. A.; MATTER, L. B.; CALLEGARI-JACQUES S.M.; BRITO, B. G.; HORN, F. Genotypes and Pathogenicity of Cellulitis Isolates Reveal Traits That Modulate APEC Virulence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, e72322, 2013. <doi:10.1371/journal.pone.0072322>

BARBOSA, M. M. C.; PINTO, F. R.; RIBEIRO, L. F.; GUARIZ, C. S. L.; FERRAUDO, A. S.; MALUTA, R. P.; RIGOBELLO, E. C.; ÁVILA, F. A.; AMARAL, L. A. Serology and patterns of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolates from pay-to-fish ponds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 43-48, 2014.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, G.A.; SIRAGUSA, G.R.; KEEN, J.E.; ELDER, R.O.; LAEGREID, W.W.E.; KOOHMARAIE, M. Genotype analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 non motile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3810-3818, 2001.

BATISSON, I.; GUIMOND, M.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516-4525, 2003.

BENAVIDES, L. E. E. Fármacos registrados utilizados no Brasil e no mundo. In: PAHOR FILHO, E.; PILARSKI, F.; ÁVILA, F. A.; BENAVIDES, L. E. E.; CARDOZO, M. V.; FERNANDES, R. N.; CARRASCHI, S. P. **Impacto do uso de fármacos na criação de peixes**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2014, cap. 3, p. 19-22.

BERALDO, L.G.; BORGES, C.A.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M.V.; RIGOBELLO, E.C.; ÁVILA, F.A. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 162-166, 2014.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 309-319, 1997.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 311–319, 2004.

BORGES, L.G.A.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 173-180, 2003.

BORGES, C. A.; BERALDO, L.G.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M.V.; GUTH, B.E.C.; RIGOBELLO, E.C.; AVILA, F.A. Shiga toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 12, p. 1119–1125, 2012.

BRÜNDER, W.; SCHMIDT, H.; FROSCH, M.; KARCH, H. The large plasmid of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. **Microbiology**, v. 145, p. 1005-1014, 1999.

CARSON, C. A.; SHEAR, B. L.; ELLERSIECK, M. R.; SCHNELL, J. D. Comparison of Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for Identification of Fecal *Escherichia coli* from Humans and Animals. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1836–1839, 2003.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1225-1234, 2003.

CDC, 2006. Centers for Disease Control and Prevention. **FoodNet surveillance report for 2004 (Final Report)**. 2006. 33p.

CDC, 2007. Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation of an *Escherichia coli* 0157:H7 Outbreak Associated with Dole Pre-Packaged Spinach.Irrigation.** 2007. 24 p.

CHAPMAN, T. A.; WU, X. Y.; BARCHIA, I.; BETTELHEIM, K. A.; DRIESEN, S.; TROTT, D.; WILSON, M.; CHIN, J. J. C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4782–4795, 2006.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3462–3465, 1996.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; DOS SANTOS, L. F.; IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; BERGAMINI, A. M. M.; GUTH, B. E. C. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 329–334, 2007.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555–4558, 2000.

CLSI, 2009. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Document MO2-A10**, v. 10. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2009.

COOKSON A. L.; BENNETT J.; THOMSON-CARTER F.; ATTWOOD G. T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6360-6369, 2007.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. RS: UFSM, 2005. p. 23-33.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapon of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n.1, p. 28-34, 2005.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6761-6769, 2002.

EARSS, 2008. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. **Annual Report**, 2008.

EDWARDS, P. R.; EWING'S, W. H. The genus *Escherichia*. In:\_\_\_\_\_. **Identification of enterobacteriaceae**. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing, 1986. cap. 6, p. 93-134.

EKLUND, M.; SCHEUTZ, F.; SIITONEN, A. Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2829-2834, 2001.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; GRENET, K.; MENAC'H, A. L. L.; RODE, L.; SALGADO, E.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; RAHIMY, M. C.; ANDREMONT, A.; DENAMUR, E.; RUIMY, R. Large-scale populationstructure of human commensal *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5698-5700, 2004.

FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Aquaculture development. 4. Ecosystem approach to aquaculture. **Technical Guidelines for Responsible Fisheries**, n. 5, Suppl. 4. Roma, 2010. 53p.

FAO, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department . **Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011**, 2013. 3 p.

FELDMAN, K. A.; MOHLE-BOETANI, C.; WARD, J.; FURST, K.; ABBOTT, S. L.; FERRERO, D., OLSEN, A.; WERNER, S. B. A cluster of *Escherichia coli* O157:non-motile infections associated with recreational exposure to lake water. **Public Health Reports**, v. 117, n. 4, p. 380–5, 2002.

FENG, P., C. H.; REDDY, S. Prevalences of Shiga Toxin Subtypes and Selected Other Virulence Factors among Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Fresh Produce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 6917–6923, 2013.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E. N., Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doença das aves**. 2th ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.2, p. 457-471.

FITZSIMMONS, K. The most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K. E CARVALHO FILHO, J. (Eds.). Rio de Janeiro. **Panorama da Aquicultura Magazine**, 2000, p. 3-8.

FDA, 2011. Food and Drug Administration. Approved drugs for use in aquaculture, 2011.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11 ed. St. Louis: Mosby, 2002.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Antibiotics as growth promotants. **Animal Biotechnology**, v. 13, p. 29-42, 2002.

GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P. M. Presence of Activatable Shiga Toxin Genotype (*stx<sub>2d</sub>*) in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* from Livestock Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3777–3783, 2003.

GONZÁLEZ, P. A. Vigilancia de la resistencia a antimicrobiano. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19 (Supl. 2), p. 135-139, 2002.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, USA, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GRACE, Y.; WANG, H. H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 163-170, 2006.

GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p. 2368–2374, 2004.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45-62, 2007.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G. ;THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. p. 267-308.

HAHM, B.K; MALDONADO, Y.; SCHREIBER E.; BHUNIA, A.K.; NAKATSU, C.H. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 387– 399, 2003.

HANSEN, D. L.; CLARK, J. J.; ISHII S.; SADOWSKY M. J.; HICKS R. E. Sources and Sinks of *Escherichia coli* in Benthic and Pelagic Fish. **Journal of Great Lakes Research**, v. 34, p. 228-234, 2008.

HEDBERG, C. W., S. J. SAVARINO, J. M. BESSER, C. J. PAULUS, V. M. THELEN, L. J. MYERS, D. N. CAMERON, T. J. BARRETT, J. B. KAPER, AND M. T. OSTERHOLM. 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 1625-1628, 1997.

ISLAM, M. A.; MONDOL, A. S.; DE BOER, E.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H.; TALUKDER, K. A.; HEUVELINKET, A. E., 2008. Prevalence and Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Slaughtered Animals in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5414–5421, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PERSONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, p. 151 –156, 2001.

KUBITZA, F. **Qualidade de água no cultivo de peixes e de camarão**. Jundiaí, 2003, p. 229.

KUMAR, H.S.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 334-338, 2001.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, E. E. C.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 103-109, 2003

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 335-342, 2005.

LIMA, A.C.N. **Residualidade da oxitetraciclina no tecido do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submetido a tratamento antibiótico.** 2004. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2004.

MACCORMICK, J. B. Epidemiology of emerging/rememerging antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 125-129, 1998.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria** Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1332-1344, 2005.

MALUTA, R. P.; FAIRBROTHER, J. M.; STELLA, A. E.; RIGOBELLO, E. C.; MARTINEZ, R.; ÁVILA, F. A. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 169, p. 89–95, 2013.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, n. 2, p. 483-491, 2005.

MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 535–546, 2000.

MANNA, S. K.; DAS, R.; MANNA, C. Microbiological quality of finfish and shellfish with special reference to shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 283-286, 2008.

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRÉ, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G.; GUTH, B. E. C.; MASANA, M. O.; CATALDI, A.; RODRÍGUEZ, H. R.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 189-198, 2004.

MAPA, 1952. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**, 154 p.

MAPA, 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)**, 2010. 13 p.

MAPA, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de produtos com licença vigente**, 2013. 196 p.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTE, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7399-7408, 2009.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 793-806, 2005.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 93, p. 179-183, 2003.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS FILHO, L. DOS; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.66, n.1, p.50–57, 2010.

MORITA, M.; MATTÉ, G. R.; DROPA, M.; MARQUES-AZEVEDO, V.; MATTÉ, M. H. Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella* spp na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros. In: ESTEVES, K. E.; SANT'ANNA, C. L. **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2006, p. 91-104.

MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 29-56, 2010.

MPA, 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Programa pesca e aquicultura**, 2010. 134 p.

MPA, 2014. Ministério da Pesca e Aquicultura, Disponível em: <[www.mpa.gov.br](http://www.mpa.gov.br)>. Acesso em: 20 fev. 2014.

MÜLLER, E. E.; EHLERS, M. M.; GRABOW, W. O. K. The occurrence of *E. coli* O157:H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption. **Water Research**, v. 35, n. 13, p. 3085–3088, 2001

MURATORI, M. C. S.; COSTA, A. P. R.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, P. C.; PODESTÁ-JUNIOR, R. L. de. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v. 8, p.50-54, 2004.

NARIMATSU, H.; OGATA, K.; MAKINO, Y.; ITO, K. Distribution of non-locus of enterocyte effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying *eae* from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4107-4114, 2010.

NATARO, J.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142 - 201, 1998.

NAYLOR R. L.; GOLDBURG R. J.; PRIMAVERA J. H.; KAUTSKY N.; BEVERIDGE M. C. M.; CLAY J.; FOLKE C.; LUBCHENCO J.; MOONEY H.; TROELL M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPLEYARD, G.; MIDDLETON, D.; FAIRBROTHER, J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242-252, 2003.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 597–603, 2006.

NICHOLLS, L.; GRANT, T.; ROBINS-BROWNE, R. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, p.275-288, 2000.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, F. C. O Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na Sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 1, 2009.

OLIVEIRA, S. D.; BESSA, M. C.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. R. I.; BRANDELLI, A.; CANAL, C. W. Phenotypic and Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 720-728, 2007.

OLSEN, S.J.; MILLER, G.; BREUER, T.; KENNEDY, M.; HIGGINS, C.; WALFORD, J.; MCKEE, G.; FOX, K.; BIBB, W.; MEAD, P. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 370–5, 2002.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, Chemistry, and Genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriology Review**, v. 41, p. 667-710, 1977.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* serotyping and in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 699-704, 1992.

OSTROFF, S. M.; KOBAYASHI, J. M.; LEWIS, J. H. Infection with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. **Journal of American Medical Association**, v. 262, p. 355-359, 1989.

PAHOR FILHO E.; MIRANDA FILHO K.; PEREIRA JR, J. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. **Aquaculture**, v. 354, p. 111-116, 2012.

PASCHOAL, J. A. R.; QUESADA, S. P.; GONÇALVES, L. U.; CYRINO, J. E. P.; REYES, F. G. R. Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 594-602, 2013.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S20-S28, 2006.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *E. coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450 - 479, 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 271-274, 2002.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2944–2947, 2005.

PEREIRA JÚNIOR, D. J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C. A. G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes, **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, 2006.

PERSING, D. H. **Molecular microbiology**: diagnostic principles and practice. Washington: ASM Press, 2004. cap.15, p.185-196.

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P.; ETHELBERG, S; SCHEUTZ, F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2020-2024, 2007.

PIGATTO, C. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; COMARELLA, L.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; FARAH, S. M. S. S.; WARTH, J. F.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 588-593, 2008.

PRETTO-GIORDANO, L. G. Desafio para o controle e a prevenção de Estreptococoses. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P. TAKEMOTO, R. M. **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá, 2012.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.

RIGOS, G.; TROISI, G.M. Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. **Reviews Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p. 53, 2005.

ROBERT KOCH INSTITUTE, 2011. **Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak.** Germany, 2011. 45 p.

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 230-235, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3ed. Londres: CSHL Press, 2001, p.1448.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, A.; VIDAL, D.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; HERRERA-LEÓN, S.; ALONSO, J. M.; REY, J. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 420-423, 2010.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, p. 1215-1226, 2008.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J, MARTIN, B. M., LEVINE, M. M., GUANDALINE, S., GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3093–3097, 1993.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia* In: GARRITY, G.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. R. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 2 ed. New York: Springer, 2005, v. 2, p. 607-625.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N. A.; MELTON-CELSA, A. R.; SANCHEZ, M.; PERSSON, S.; O'BRIEN, A. D. Multicenter evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951, 2012.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4908-4915, 2000.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.12, 5675-5682, 2001a.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W. L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *seC* in Locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6863-6873, 2001b.

SEBRAE, 2008. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aqüicultura e pesca: tilápias**, 2008. 161 p.

SLANEC, T.; FRUTH, A.; CREUZBURG, K.; SCHMIDT, H. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6187-6197, 2009.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 653-658, 2002.

TARR, C. L.; LARGE, T. M.; MOELLER, C. L.; LACHER, D. W.; TARR, P. I.; ACHESON, D. W.; WHITTAM, T. S. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6853-6859, 2002.

TAVECHIO W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 335-341, 2009.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 35, p. 269-275.

TRISTÃO. L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R.C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 358–365, 2007.

TOMA, C.; MARTINEZ ESPINOSA, E.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4937-4946, 2004.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In:\_\_\_\_\_. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 171-194.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

VETTORATO, M. P.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brasil. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 103-109, 2003.

VETTORATO, M. P.; DE CASTRO, A. F. P.; CERGOLE-NOVELLA, M. C.; CAMARGO, F. L. L.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in São Paulo, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 53-59, 2009.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1787-1789, 2004.

VILJANEN, M. K.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S. Y.; OLKKONEN, L.; JÄRVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v. 336, p. 831-834, 1990.

WASTESON, Y. Zoonotic *Escherichia coli*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n. 95, p. 79-84, 2001.

WEIGEL R. M.; QIAO, B.; TEFEREDEGNE, B.; SUH, D. K.; BARBER, D. A.; ISAACSON, R. E.; WHITE, B. A. Comparison of pulsed field electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.205-217, 2004.

WEINSTEIN, D. L.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 106-111, 1988.

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M. H.; ANNUNOU, A.; TSCHAPE, H. Strong Association Between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroups O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 726-730, 2003.

WILLEMS, R. J. L.; TOP, J.; VAN SANTEN, M.; ROBINSON, D. A.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; GRUNDMANN, H.; BONTEN, M. J. M. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, 821-828. 2005.

WHO, 2000. World Health Organization. **Annual Report on Infectious Disease: Overcoming Antimicrobial Resistance**. Geneva, Switzerland, 2000. Disponível em: <[www.who.int/infectious-disease-report/2000](http://www.who.int/infectious-disease-report/2000)>. Acesso em: 23 dez. 2013.

WU, X.Y.; CHAPMAN, T.; TROTT, D. J.; BETTELHEIM, K.; DO, T. N.; DRIESEN, S.; WALKER, M. J.; CHIN, J. Comparative Analysis of Virulence Genes, Genetic Diversity, and Phylogeny of Commensal and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Weaned Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83-91, 2007.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2033-2039, 2003.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 9, p. 239-266.