

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE  
MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS, IDENTIFICADOS NO SOLO/AREIA DE PARQUES E PRAÇAS  
DE RECREAÇÃO

MARTA CATARINA FERNANDES

Botucatu – SP  
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE  
MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS, IDENTIFICADOS NO SOLO/AREIA DE PARQUES E PRAÇAS  
DE RECREAÇÃO

MARTA CATARINA FERNANDES

Dissertação  
apresentada junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Nome do Autor: Marta Catarina Fernandes

Título: INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, IDENTIFICADOS NO SOLO/AREIA DE PARQUES E PRAÇAS DE RECREAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Vamílton Álvares Santarém

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública II

Hospital Veterinário – Unoeste – Presidente Prudente

Data da Defesa: 25 de fevereiro de 2010.

*“ Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com intensidade. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”*

*Charles Chaplin*

*“Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

*Fernando Pessoa*

**DEDICATÓRIA**

*Às pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos pais, Lenice e Antonio, que nunca mediram esforços para minha formação, obrigada pelo incentivo, apoio e amor incondicional sempre.*

## ***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

*Ao estimado Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, exemplo de orientador e pesquisador, por seu espírito formador, agradeço pela oportunidade, confiança, amizade e dedicação ao me delegar um projeto tão valioso.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por todas as bênçãos a mim concedidas, por tudo que sou e por tudo aquilo que ainda preciso melhorar como pessoa.*

*Aos meus irmãos, Marcel, Marco e Müller, às minhas cunhadas, Andréa, Adriane e Patrícia, e às minhas queridas sobrinhas Daniela e Ana Luiza, obrigada por colaborarem com este sonho, com apoio, amor e amizade.*

*Ao meu noivo Thiago, pela força e incentivo e pela tolerância com que suportou os momentos difíceis e as minhas longas ausências desde o tempo da graduação. Obrigada pelo amor e companheirismo constante!*

*Aos professores Aristeu Vieira da Silva, Vamilton Álvares Santarém, Domingos da Silva Leite, José Paes de Almeida Nogueira Pinto e Shinji Takai pela grandiosa colaboração com a pesquisa, abrindo as portas de seus laboratórios e equipes para treinamento das técnicas e/ou processamento das amostras. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.*

*À professora Mariza Langraf, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela gentileza em nos ceder a cepa padrão de E.coli O157:H7 (EDL 933).*

*Fernando José Paganini Listoni, muito obrigada pelo importante apoio no andamento da pesquisa e disponibilidade, pelo seu trabalho cuidadoso e competente, pela amizade e convivência durante estes quatro anos de MI.*

*Aos Professores Antonio Carlos Paes, Jane Megid, Hêlio Langoni, Paulo Domingues, Rafael Modolo, pelos ensinamentos e suporte fundamentais.*

*Aos pós-graduandos com os quais compartilhei um pouco da minha vida: alegrias, incertezas, além de inesquecíveis momentos de bonita amizade e que tive a maravilhosa oportunidade de conhecer nesta caminhada: Camila, Larissa, Priscila, Tatiana, Amanda, Daniela, Júlia, Ricardo, Luciana e Gustavo.*

*Aos funcionários da pós-graduação, do arquivo, da biblioteca, obrigada pela inestimável ajuda.*

*Aos responsáveis pelas praças e parques amostrados, pela disponibilidade em nos permitir a realização das colheitas de areia ao longo do estudo;*

*À Fapesp (07/57781-3) pelo apoio financeiro a esta pesquisa, muito obrigada!*

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças de recreação públicos e privados, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, SP, 2008-2009. ....39
- Quadro 2 - Reagentes para as reações de PCR na detecção de fatores de virulência de *E. coli* isoladas de areia de praças e parques públicos e privados. Botucatu, SP, 2008-2009. ....40
- Quadro 3 - Iniciadores utilizados para classificação filogenética de linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças de recreação públicos e privados, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, SP, 2008-2009.....41
- Quadro 4 - Primers dirigidos ao gene da RdRp utilizados na nested-RT-PCR para a detecção de coronavírus bovino, em amostras de areia de parques e praças de recreação públicos e privados. Botucatu, SP, 2008-2009. ....46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Frequência de enteropatógenos identificados na areia de parques e praças recreacionais, segundo o mês de obtenção das amostras. Botucatu, SP, 2008-2009. ....49
- Tabela 2 - Frequência de enteropatógenos identificados na areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de obtenção das amostras. Botucatu, SP, 2008-2009. ....51
- Tabela 3 - Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de coliformes totais em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....52
- Tabela 4 - Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de *Escherichia coli* em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....53
- .
- Tabela 5 - Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de coliformes totais em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....55
- Tabela 6 - Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de *Escherichia coli* em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....55
- Tabela 7 - Marcadores de virulência identificados em linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças recreacionais nos meses de agosto e novembro. Botucatu, SP, 2008. ....57

Tabela 8 - Marcadores de virulência identificados em linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de areia de parques e praças recreacionais nos meses de fevereiro e maio. Botucatu, SP, 2009. ....	58
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequências relativas de detecção de diferentes enteropatógenos em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	51
Figura 2 - Frequências relativas de detecção de diferentes enteropatógenos em amostras de areia de parques e praças públicas ou privadas. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	52
Figura 3 - Mediana e percentis das contagens de coliformes totais em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	54
Figura 4 - Mediana e percentis das contagens de <i>Escherichia coli</i> em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	54
Figura 5 - Mediana, percentis e valores extremos (não <i>outlayers</i> ) das contagens de coliformes totais em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	56
Figura 6 - Mediana, percentis e valores extremos (não <i>outlayers</i> ) das contagens de <i>Escherichia coli</i> em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A/E = “attaching and effacing”

*afa* = gene codificador de adesina afimbrial

BcoV = coronavírus bovino

BFP = “bundle forming pilus”

BHI = caldo cérebro coração

BS = ágar bismuto sulfito

cGMC = enzima guanilato ciclase

CNF = fator necrosante citotóxico

DAEC = *Escherichia coli* de aderência difusa

DAF = decay accelerating factor

DEC = *Escherichia coli* diarreio gênica

EAF = plasmídio de *E. coli* enteropatogênica

EAST 1 = toxina termoestável de *Escherichia coli* enteroagregativa

ExPEC = *Escherichia coli* extra-intestinal

GI/II/III = variantes de *papG*

HeLa = células de linhagem contínua de carcinoma epitelial de cérvix humana

Hep2 = células de linhagem contínua de carcinoma de laringe humana

*hly* = gene codificador de hemolisina

HmLu = células de pulmão de hamster

HMR = hemaglutininas resistente a manose

IE = infecção extra-intestinal

*ipaH* = gene de *Escherichia coli* enteroinvasora

ITU = infecção do trato urinário

*iuc* = gene codificador de aerobactina

Kda = quilo dálton

LIA = lisina iron agar

LT = termolábil

MA104 = células de rim fetal de macaco Rhesus

MAD = método de aglutinação direta

MgCl<sub>2</sub> = cloreto de magnésio

mM = mili Molar

MNEC = *Escherichia coli* associada com meningite neonatal

NANAT = nalidixic ácido, novobiocin, actidione and telurit potasse

NCDV = Nebraska Calf Diarrhea Virus

NMP = número mais provável

PAI = ilha de patogenicidade

*papG* = subunidade G da fímbria P

PET = "plasmid encoded protein" de *Escherichia coli* enteroagregativa

RV = Rappaport Vassiliadis

*saa* = gene codificador de adesina autoaglutinante

SARS-COV = vírus da pneumonia asiática

*sfa* = gene codificador da fímbria S

ST = termoestável

STEC = *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Stx = toxina de Shiga

TSA = tryptic soy agar

TSI = triple sugar iron

TT = caldo tetracionato

UFC = unidade formadora de colônia

UPEC = *Escherichia coli* uropatogênica

*Vap* = *virulence associated protein*

VT = verotoxina

XLD = xilose lisina desoxicolato

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	01
	<b>ABSTRACT</b> .....	02
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	03
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	08
	2.1 <i>Rodococose</i> .....	08
	2.2 <i>Colibacilose</i> .....	12
	2.3 <i>Salmonelose</i> .....	19
	2.4 <i>Toxoplasmose</i> .....	21
	2.5 <i>Larva Migrans Visceral/Ocular</i> .....	25
	2.6 <i>Coronavirose</i> .....	28
	2.7 <i>Rotavirose</i> .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
	4.1 <i>Descrição do município de colheita</i> .....	34
	4.2 <i>Locais e períodos de colheita</i> .....	34
	4.3 <i>Colheita de material</i> .....	34
	4.4 <i>Estoque de linhagens</i> .....	35
	4.5 <i>Diagnóstico de R. equi</i> .....	35
	4.5.1 <i>Caracterização microbiológica</i> .....	35
	4.5.2 <i>Determinação de antígenos e plasmídios de virulência</i> ....	35

4.5.2.1	Imunobloting.....	36
4.5.2.2	Extração de DNA plasmidial.....	36
4.5.2.3	Reação em cadeia pela polimerase.....	36
4.6	<i>Diagnóstico de E. coli</i> .....	37
4.6.1	Caracterização microbiológica.....	37
4.6.2	Cultivo microbiológico em Ágar MacConkey Sorbitol.....	37
4.6.3	Caracterização do sorotipo O157:H7.....	37
4.6.4	Reação em cadeia pela polimerase.....	38
4.6.5	Filogenia.....	41
4.6.6	Contagem de coliformes totais a 35°C e <i>E. coli</i> .....	41
4.7	<i>Diagnóstico de Salmonella sp</i> .....	42
4.7.1	Caracterização microbiológica.....	42
4.7.2	Teste de aglutinação com soro polivalente e caracterização de sorotipos.....	42
4.8	<i>Diagnóstico de Toxocara sp</i> .....	43
4.8.1	Recuperação de ovos.....	43
4.9	<i>Diagnóstico de T. gondii</i> .....	43
4.9.1	Recuperação de oocistos.....	43
4.9.2	Inoculação em camundongos.....	44
4.10	<i>Diagnóstico de Coronavírus Bovino (BcoV)</i> .....	44
4.10.1	Reação de transcriptase reversa.....	44
4.10.2	Extração de RNA.....	44
4.10.3	Síntese de cDNA (Transcrição Reversa).....	45

4.10.4	Primeira amplificação.....	45
4.10.5	Segunda amplificação (Nested).....	45
4.10.6	Vírus de referência.....	46
4.11	<i>Diagnóstico de Rotavírus</i> .....	46
4.11.1	Extração de RNA.....	46
4.11.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	47
4.11.3	Vírus de referência.....	47
4.12	<i>Análise estatística</i> .....	48
5	<i>RESULTADOS</i> .....	49
6	<i>DISCUSSÃO</i> .....	59
7	<i>CONCLUSÕES</i> .....	67
8	<i>REFERÊNCIAS</i> .....	69
9	<i>TRABALHO CIENTÍFICO</i> .....	91

FERNANDES, M.C. **Indicadores de contaminação microbiológica e pesquisa de marcadores de virulência de enteropatógenos de animais domésticos, identificados no solo/areia de parques e praças de recreação.** Botucatu, 2010. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O presente estudo avaliou os riscos de contaminação microbiológica por *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* sp., *Coronavírus* e *Rotavírus*, na areia de cinco praças públicas e cinco parques privados, em Botucatu, SP, ao longo das quatro estações do ano, entre 2008 a 2009. De 200 amostras avaliadas, foram isoladas 23 (11,5%) linhagens de *R. equi*, das quais 13% de praças públicas e 10% de parques privados. As linhagens foram avaliadas quanto à virulência plasmidial e classificadas como avirulentas. Foram isoladas 63 (31,5%) linhagens de *E. coli*, das quais 34% de praças públicas e 29% de parques privados. Dentre os marcadores de virulência de *E. coli* foram encontrados os genes *eae*, *bfp*, *saa*, *iucD*, *papGI*, *sfa* e *hly*. As contagens de coliformes totais e *E. coli* atingiram níveis de até  $10^3$  UFC/g de areia. Houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) na contagem de *E. coli* entre os meses de colheita, com maiores valores nos meses de verão e outono. Foram encontrados ovos de *Toxocara* sp. em três locais, dois públicos e um privado somente no período de inverno. *Coronavírus* foi identificado somente em uma amostra de praça pública. A presença de enteropatógenos de potencial zoonótico na areia de parques de recreação pública e privada indica a necessidade de cuidados para a melhoria das condições sanitárias do ambiente destes locais, com intuito de reduzir os riscos da transmissão de doenças veiculadas pelas fezes de animais para os humanos, especialmente crianças.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental; *E. coli*; *R. equi*; *Toxocara* sp.; *Coronavírus* sp.

FERNANDES, M.C. **Indicators of microbiological contamination and study of virulence markers of enteropathogens from domestic animals, identified in soil/sand of parks and squares recreation.** Botucatu, 2010. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The present study reported the risks of microbiological contamination by *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* sp., *Coronavírus* and *Rotavírus*, identified in sand samples collected from five public squares and five private parks, in Botucatu city, state of São Paulo, in the four seasons of the year between 2008-2009. From 200 samples evaluated, were isolated 23 (11,5%) strains of *R. equi*. From these, 13% were obtained of public squares and 10% of the private parks. The virulence plasmids of *R. equi* strains were avirulents. Were isolated 63 (31,5%) strains of *E. coli*, corresponding to 34% of public squares and 29% of the private parks. Among the virulence factors of *E. coli* were identified the genes *eae*, *bfp*, *saa*, *iucD*, *papGI*, *sfa* and *hly*. Countings of total coliforms and *E. coli* were identified in levels of up to  $10^3$  UFC/g of samples. Statistical difference ( $P < 0,05$ ) was observed between *E. coli* counting and months sampled, with higher values in summer and autumn. Eggs of *Toxocara* sp. were found in three places, two publics and one private only in the winter. *Coronavírus* was identified only in a sand sample of public square. The presence of enteropathogens in sand of parks and squares indicate the necessity of cares for the improvement of the sanitary conditions of the environment, with the purpose to reduce the risks of the transmission of diseases propagated for feces of animals for the human, especially children.

**Key words:** environmental contamination; *E. coli*; *R. equi*; *Toxocara* sp.; *Coronavírus* sp.

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos entéricos constituem uma das principais classes de patógenos para humanos e animais. Este grupo peculiar de organismos caracteriza-se por manterem a capacidade infectante por meses em condições adversas do ambiente, após a eliminação fecal pelos animais. Em sua grande maioria, estabelecem infecção nos susceptíveis mediante a contaminação de alimentos de origem animal, água, verduras e frutas. O contato estreito com animais – especialmente de companhia -, ou mesmo com o ambiente de criação ou habitat dos animais, favorece a transmissão de enteropatógenos dos animais para os humanos (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

No Brasil e em outros países é comum o uso de caixas de areia/solo em parques e praças de recreação para o entretenimento, particularmente de crianças e adolescentes. O acesso de animais domésticos e aves, a deficiente higienização dos locais, o hábito de geofagia ou precária higiene pessoal de crianças, e a falta de conscientização da população em geral quanto aos riscos representados por microrganismos entéricos, torna estes locais propícios e de alto risco à veiculação de enteropatógenos para os humanos. Dentre os patógenos de animais domésticos de veiculação fecal, de reconhecido potencial zoonótico, e elevada resistência ambiental, destacam-se: *Rhodococcus equi* (*R. equi*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Toxocara* sp., *Coronavírus* sp. e *Rotavírus* sp. (ACHA e SZYFRES, 2003).

*R. equi* são bactérias de comportamento oportunista, relacionadas a graves infecções piogranulomatosas nos animais e humanos. O microrganismo é eliminado pelas fezes de várias espécies de animais domésticos, multiplicando-se ativamente no solo que contenha material de origem fecal, mantendo-se viável por vários meses no ambiente (LINDER, 1997). A patogenicidade do organismo foi relacionada à presença de marcadores de virulência (plasmídios e proteínas), identificados em linhagens isoladas de animais (potros, suínos, cães, gatos) e em humanos imunossuprimidos, em especial acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS (TAKAI, 1997). Não está completamente esclarecido o papel do ambiente e dos animais na transmissão da rodococose para os humanos, visto que se tem

identificado linhagens virulentas e avirulentas no ambiente. No entanto, a detecção de marcadores de virulência de *R. equi* é imprescindível para a investigação da epidemiologia da doença em humanos e em animais, assim como para avaliar os reflexos em saúde pública da rodococose. No Brasil são praticamente incipientes os estudos direcionados à caracterização de virulência em linhagens de *R. equi* isoladas de animais, de humanos, tampouco do ambiente (RIBEIRO et al., 2007).

*E. coli* é reconhecida como a enterobactéria mais importante para animais e humanos. As linhagens patogênicas estão relacionadas a diferentes tipos de infecções e compreendem pelo menos seis patótipos associados às infecções intestinais (DEC – “Diarrheagenic *Escherichia coli*”) e vários outros associados com infecções extra-intestinais (ExPEC – “Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*”). As manifestações clínicas entéricas e extra-entericas das colibaciloses estão associadas a diferentes fatores de virulência, que conferem grande habilidade de adaptação da bactéria a diferentes sítios de infecção (KAPER et al., 2004). Estes fatores são constituídos por componentes intrínsecos da estrutura bacteriana (lipopolissacarídeos ou endotoxinas), ou são representados por diferentes cito ou exotoxinas (hemolisinas, fator necrosante citotóxico-CNF, verotoxinas-VT ou “Shiga like toxin”- STx, enterotoxinas), assim como propriedades que permitem a multiplicação em meios com restrição de ferro (sideróforos), a multirresistência aos antimicrobianos e/ou a colonização celular (pili, adesinas ou fímbrias) (SUSSMAN, 1997).

Linhagens da classe enterohemorrágica - sorotipo O157:H7 - têm sido investigadas recentemente quanto à produção de verotoxinas, de efeito citotóxico. As estirpes produtoras desta toxina causam, nos humanos, graves manifestações clínicas de colite hemorrágica e falha renal aguda, de curso fatal em crianças e pacientes debilitados. Os quadros clínicos estão intimamente relacionados ao consumo de carne e subprodutos de origem bovina – com cocção inadequada -, leite e derivados, verduras, frutas e água contaminadas com as fezes de animais (TAUXE, 1997). Não está claramente estabelecido o impacto da presença deste sorotipo patogênico no ambiente dos humanos. A despeito da ocorrência do sorotipo O157:H7 em humanos na América Latina, são pouco freqüentes as identificações de linhagens O157:H7 verotoxigênicas

no Brasil, fato que dificulta aquilatar o real impacto da doença no país (RIBEIRO et al., 1999). Ademais, são também escassos os estudos no Brasil voltados a investigação de O157:H7 no ambiente dos humanos, particularmente de fácil acesso às crianças, em face da alta mortalidade neste grupo de risco.

O gênero *Salmonella* freqüentemente é incriminado como agente causal de severos surtos de infecções e toxinfecções de origem alimentar nos humanos (RIBEIRO et al., 2010). O microrganismo possui vários sorotipos que são comuns aos animais e humanos. A bactéria é eliminada intermitentemente pelas fezes por várias espécies de animais domésticos, répteis, anfíbios e aves – com e sem sinais entéricos -, mantendo-se viável por vários meses no ambiente (ACHA e SZYFRES, 2003). Determinados sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de animais são reconhecidos como emergentes da salmonelose em humanos, como o sorotipo Enteritidis (RIBEIRO et al., 2003).

A toxoplasmose figura dentre as zoonoses mais freqüentes em todo o mundo (ACHA e SZYFRES, 2003). A doença provoca severos agravos aos humanos, incluindo abortamentos, distúrbios oculares e seqüelas neurológicas, irreversíveis nos fetos de mulheres em certas fases gestacionais. Nos animais, a doença manifesta-se por grande complexidade de sinais, incluindo manifestações entéricas, respiratórias, neurológicas e da esfera reprodutiva (GREENE, 2006). Os felinos eliminam o parasito pelas fezes sob a forma de oocistos que, ao esporularem no ambiente, podem infectar os humanos e animais, principalmente pela via oral (DUBEY et al., 1994).

*Toxocara* sp. são altamente prevalente em cães e gatos no Brasil. Estes animais de companhia eliminam altas cargas de ovos pelas fezes, contaminando o ambiente. Determinadas características estruturais conferem alta resistência ambiental aos ovos (GREENE, 2006). A ingestão acidental dos ovos pelos humanos desencadeia a “larva migrans visceral”, que gera graves lesões em órgãos como pulmão, fígado e a “larva migrans ocular”, determinadas pela migração larval errática do parasito (ACHA e SZYFRES, 2003). Crianças entre 6 meses a 5 anos são particularmente susceptíveis, provavelmente pelo hábito de geofagia ou pela notória deficiência de higiene pessoal nesta faixa etária, favorecendo a transmissão do parasito via fecal-oral (COELHO et al., 2001). No Brasil, iniciativas isoladas de pesquisadores têm

revelado de forma preocupante a contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* sp. em ambientes de recreação dos humanos, alertando para a importância deste achado no contexto de saúde animal e de saúde pública (SANTARÉM et al., 1998).

O gênero *Coronavírus* pode infectar várias espécies de mamíferos e de aves. Este vírus possui tropismo pelas células epiteliais intestinais e respiratórias. Nos animais causam doenças como a bronquite infecciosa das galinhas, a gastroenterite transmissível dos suínos, enterite em cães, bovinos e felinos, e a peritonite infecciosa dos felinos. As infecções em animais geralmente são inaparentes (QUINN et al., 2005). O interesse por essa família aumentou recentemente com a classificação de um novo coronavírus humano, causador da pneumonia asiática (SARS-COV), visto que classicamente os patógenos deste gênero estavam relacionados aos resfriados comuns em humanos (FLORES, 2007). Os coronavírus não são estritamente espécie-específicos e são capazes de mutações freqüentes. Podem infectar novas espécies e, portanto, é possível a infecção cruzada entre animais e humanos (GREENE, 2006).

O gênero *Rotavírus* é considerado um dos principais vírus entéricos para os animais e humanos. Encontram-se amplamente disseminados na natureza e acometem humanos, aves, animais domésticos e silvestres. As infecções por rotavírus constituem uma das principais causas de morbimortalidade infantil em todo o mundo (CDC, 1991; GLASS et al., 1991; ACHA e SZYFRES, 2003). A excreção viral em altos títulos por períodos prolongados, a existência de portadores e a alta resistência ambiental contribuem para a ampla disseminação da rotavirose. O vírus é predominantemente espécie-específico. Entretanto, infecções heterólogas são relatadas. Cepas virais geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas. De maneira similar, cepas de rotavírus do grupo A, de origem humana, têm sido identificadas em animais (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1993; DE LEENER et al., 2004; STEYER et al., 2008). A rotavirose afeta principalmente crianças de até cinco anos de idade, com predomínio entre seis meses a um ano de idade (ACHA e SZYFRES, 2003). Nos animais, a rotavirose ocorre

predominantemente nas primeiras semanas de idade (RADOSTITS et al., 2007).

A identificação de patógenos de veiculação entérica de origem animal em ambientes de recreação infantil e/ou do cotidiano dos humanos, contemplam quase que exclusivamente o estudo de um tipo de patógeno (TAKAI et al., 1996; HAYASHI et al., 1992; SANTARÉM et al., 1998; SCHUTZE et al., 1999; PENA et al., 2006). Não se tem notado na literatura especializada esforços no intuito de avaliar, simultaneamente, os principais patógenos de veiculação fecal de animais domésticos em ambientes do cotidiano humano - quais sejam de origem bacteriana, parasitária e/ou viral -, tampouco investigar marcadores de virulência nestes microrganismos, que possam sinalizar o impacto da patogenicidade dos isolados. Ademais, pouca ênfase é observada em recomendar ações práticas e factíveis que possam, no mínimo, reduzir a contaminação dos ambientes.

Com efeito, o presente estudo avaliou a presença de *R. equi*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *T. gondii*, *Toxocara* sp., *Coronavírus* e *Rotavírus* na areia de parques e praças de recreação infantil, utilizando estes patógenos como indicadores de contaminação ambiental. Foi investigada também a presença de marcadores de virulência nos isolados de *R. equi* e *E. coli*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 RODOCOCOSE

A rodococose é uma doença infecto-contagiosa causada por *R. equi* e relacionada a diversas manifestações clínicas em animais e humanos. A doença se caracteriza por lesões piogranulomatosas, de difícil resolução terapêutica (LINDER, 1997).

*R. equi* é eliminado pelas fezes de herbívoros ou onívoros, incluindo eqüinos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervos. Raramente é isolado das fezes de humanos e de cães, e ainda não foi isolado das fezes de gatos (PRESCOTT, 1991).

O eqüino é a principal espécie animal acometida pelo *R. equi*, especialmente os potros. Clinicamente a doença se manifesta por infecções pulmonares e, em menor freqüência, por distúrbios entéricos e/ou articulares. Nos suínos o comportamento não é progressivo, apresentando-se como linfadenite com lesões semelhantes às observadas na tuberculose (TAKAI et al., 1997). Em outras espécies animais ocorre sob a forma de enterite, linfadenite, abortamento, mastite, dermatite e piometra (PRESCOTT, 1991; RIBEIRO et al., 2007).

Em animais de companhia as infecções por *R. equi* são mais freqüentes em gatos do que em cães. A via transcutânea parece representar a principal forma de infecção para cães e gatos. O comportamento agressivo dos gatos em disputas territoriais ou por fêmeas no cio favorece a veiculação transcutânea da bactéria, presente na região ungueal, para a pele dos animais (GREENE, 2006; FARIAS et al., 2007). Os principais sinais da rodococose nestas espécies são: linfadenite, abscessos de pele, pneumonia abscedante, piotórax, hepatomegalia e lesões abscedantes em órgãos diversos. Em gatos, a bactéria geralmente está associada à co-infecção com doenças imunossupressivas, como o vírus da imunossupressão e da leucemia felina (GREENE, 2006).

A virulência das linhagens de *R. equi* é atribuída à presença de plasmídios e antígenos (proteínas) denominados VAP (*virulence associated protein*), que redirecionaram os estudos quanto a epidemiologia e

patogenicidade em linhagens isoladas de animais, humanos e do ambiente. As linhagens virulentas possuem plasmídios de 15 a 17 kDa que codificam proteínas denominadas VapA e são encontradas em estirpes isoladas de pneumonia em potros e pacientes HIV-positivos. As estirpes de virulência intermediária (20 kDa) possuem plasmídios que codificam as proteínas VapB e são identificadas na linfadenite em suínos e, predominantemente, em pacientes com AIDS. As estirpes avirulentas (não detentoras dos plasmídios supracitados), predominam no ambiente de criação de herbívoros domésticos (solo, fezes), especialmente em criatórios de eqüinos e bovinos e também em pacientes humanos HIV-positivos (HINES et al., 1997; TAKAI et al., 1997).

Atualmente são reconhecidos 11 tipos clássicos de plasmídios virulentos: 85 kb tipos I, II, III e IV; 87 kb tipo I e II; 90 kb tipos I, II, III, IV e V. Os 11 tipos clássicos de plasmídios virulentos que codificam VapA apresentam distribuição geográfica distinta nos diferentes continentes. A maioria das estirpes encontradas nas Américas, Austrália e Europa correspondem aos tipos 85 kb tipo I ou 87 kb tipo I. Na França é encontrado o plasmídio 85 kb tipo II, e nos EUA (Texas) o 85 kb tipo III e IV. Os plasmídios 87 kb tipo II e 90 kb tipos I a IV foram detectados somente no Japão (TKACHUK-SAAD e PRESCOTT, 1991; RAHAL et al., 1999; TAKAI et al., 1999; BECU et al., 2000; TAKAI et al., 2001; TAKAI et al., 2001a; YUYAMA et al., 2002).

Takai et al. (2003) investigaram a virulência de estirpes de nove cães e nove gatos com diferentes afecções por *R. equi*, dos quais um dos gatos era procedente do Brasil. Foram identificadas estirpes virulentas em cinco gatos e em um cão, alertando para a maior prevalência de linhagens virulentas em gatos e a preocupação do convívio destes animais com pacientes HIV-positivos. No Brasil, Farias et al. (1998) descreveram pioneiramente a piogranulomatose cutânea em gato, secundária à infecção por *R. equi*. Estudo posterior caracterizou a virulência da estirpe como VapA, semelhante ao padrão encontrado em potros (FARIAS et al., 2007).

A rodococose em humanos é reconhecida como doença emergente (LINDER, 1997; ACHA e SZYFRES, 2003). As infecções por *R. equi* são descritas em indivíduos debilitados ou imunossuprimidos, transplantados, portadores de neoplasias, submetidos à terapia prolongada com corticóide e,

em especial, pacientes acometidos pela AIDS (LINDER, 1997; TAKAI et al., 2002). Estima-se que, em média, 39,4 milhões de pessoas convivam atualmente com a AIDS em todo o mundo. Conforme a Organização Panamericana da Saúde-OPS (2001), 88% da casuística da rodococose é atribuída a co-infecção pelo vírus da AIDS. No Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica assinalou que entre 1980 e 2006 ocorreram 433 mil casos de AIDS oficialmente notificados. Até metade da década de 90, a incidência foi crescente, alcançando em 1998 cerca de 19 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2007).

Verville et al. (1994), nos EUA, investigaram a epidemiologia de 12 casos de rodococose em humanos, dos quais seis eram HIV-positivos, e constataram que dois tinham histórico de contato estreito com eqüinos e seu ambiente de criação e outro com ambiente rural. No Brasil, Caterino-de-Araújo et al. (2000) descreveram o primeiro caso de rodococose em humano acometido por AIDS, que apresentava sinais de pneumonia, do qual foi isolada estirpe de virulência intermediária. Severo et al. (2001) relataram dois casos no Rio Grande do Sul, um dos quais em paciente HIV-positivo.

A transmissão de *R. equi* dos animais para os humanos está relacionada à exposição ao agente no ambiente, secundária à inalação, lesões transcutâneas, (PRESCOTT, 1991; ADAL et al., 1995), pelo contato estreito com animais domésticos ou seu ambiente de criação. Prescott (1991) referiu que 12 dentre 32 humanos acometidos de rodococose tinham histórico de contato com animais e/ou ambientes de criação de espécies domésticas.

Clinicamente, a rodococose nos humanos manifesta-se por pneumonia cavitária crônica com derrame pleural, acompanhada de febre, tosse e dores no peito. Secundariamente são observados quadros extrapulmonares como: abscessos renais, diarreia com sangue, caquexia, pleurisia, hepatopatias, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e meningite (BROWN, 1995; SEVERO e LONDERO, 1996).

*R. equi* multiplica-se ativamente no ambiente, tendo como exigência condições mínimas de temperatura, pH e umidade, obtidas principalmente no material fecal de animais. Multiplica-se em extremos de temperatura (15°C a 37°C), mas preferencialmente em ambientes quentes, fato que justificaria a elevada ocorrência do microrganismo em países de clima tropical. Em

contraste, o microrganismo não se multiplica abaixo de 10°C. Diferenças entre as condições ambientais a cada ano, principalmente de temperatura, poderiam determinar as variações anuais e sazonais nas infecções em animais domésticos (PRESCOTT, 1991).

O isolamento de *R. equi* do ambiente é maximizado com o emprego de meios especiais que contenham fármacos impeditores para outros microrganismos ambientais e fecais, como o meio de Nanat (TAKAI et al., 1996). Takai et al. (1996) isolaram *R. equi* em 73,9% amostras de areia e terra de 115 parques e 49 jardins no Japão. Nenhum dos isolados apresentou plasmídios de 15-17 kDa e um apresentou plasmídio de 20 kDa. Os autores alertaram para a extrema contaminação do ambiente de parques e praças no Japão pela bactéria e destacaram a necessidade de estudos com intuito de avaliar o risco de contaminação destes ambientes na transmissão da rodococose. Na Hungria, a virulência de 48 estirpes isoladas do solo de dois criatórios de eqüinos revelou 26 (54,2%) linhagens virulentas VapA (85 kb tipo I) (MAKRAI et al., 2002).

No Brasil são pontuais os estudos envolvendo a virulência plasmidial de estirpes de *R. equi* isoladas dos animais e humanos. Ribeiro et al. (2006) revelaram elevada virulência de linhagens isoladas de potros, no estado de São Paulo, enquanto Farias et al. (2007) relataram a virulência de *R. equi* em gato com infecção cutânea. Não existe, até o momento, nenhum estudo no país que tenha investigado a virulência de estirpes isoladas do ambiente dos humanos.

O reconhecimento dos antígenos de virulência do microrganismo e a sua utilização como marcador de patogenicidade tem permitido avanços significativos na identificação do perfil de virulência e de novas variantes da bactéria, e são imprescindíveis no esclarecimento da epidemiologia, patogenia, controle e reflexos em saúde pública da doença (RIBEIRO et al., 2007).

## 2.2 COLIBACIOSE

*E. coli* é o principal representante das bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se sob a forma de cocobacilos Gram-negativos, encontrados na microbiota entérica de animais e humanos (CAMPOS e TRABULSI, 1999). Determinadas linhagens são patogênicas para animais e humanos. Nos animais, acarreta classicamente quadros gastroentéricos e grande variedade de outras afecções, incluindo mastite, diarreia, endometrite, cistite, nefrite, artrite, abortamento, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite, septicemia, entre outros (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

Nos humanos, determina principalmente distúrbios gastrintestinais graves, infecções urinárias, meningites em recém-nascidos e septicemias (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Campos e Trabulsi (1999) afirmaram que *E. coli* é responsável por cerca de 40 a 50% da casuística de septicemias por bactérias Gram-negativas em humanos.

O microrganismo pode ser isolado quase que invariavelmente do material fecal de animais com e sem diarreia. A severidade clínica das colibaciloses depende da presença de fatores de virulência, que determinam a patogenicidade da linhagem. Certos fatores de virulência são componentes intrínsecos da estrutura bacteriana (lipopolissacarídeos), também denominados endotoxinas (CASTRO e YANO, 1992). Outros se constituem de diferentes tipos de exotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, hemolisinas e fator necrosante citotóxico), certas propriedades que permitem a multiplicação em meios com baixa disponibilidade de ferro ou relacionados a multirresistência aos antimicrobianos (CAMPOS e TRABULSI, 1999).

As estirpes patogênicas podem causar diversos tipos de infecções e compreendem pelo menos seis patótipos associados às infecções intestinais (DEC – “Diarrheagenic *Escherichia coli*”) e vários outros associados com infecções extra-intestinais (ExPEC – “Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*”). As diferentes linhagens de *E. coli* responsáveis predominantemente por distúrbios entéricos são agrupadas em seis tipos: enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EAEC) e de aderência difusa (DAEC), subdivididas, fundamentalmente, pela capacidade de produção de

determinadas toxinas, de invasão celular ou de manifestação de sinais clínicos em humanos e/ou nos animais (RIBEIRO et al., 1999).

EPEC foi o primeiro patótipo descrito de *E. coli* diarreiogênica. Esta classe predomina como causa de diarreia em crianças com menos de um ano, sobretudo em países emergentes. Clinicamente se manifesta por diarreia aquosa contendo muco, febre e desidratação (NATARO e KAPER, 1998).

Linhagens EPEC determinam lesão histopatológica intestinal conhecida por “*attaching and effacing*” (A/E). A bactéria se adere intimamente às células epiteliais intestinais e acarreta mudanças no citoesqueleto celular. As microvilosidades intestinais formam estruturas parecidas com “pedestais”, a qual a bactéria se adere na mucosa. A habilidade de induzir o A/E é codificada pelo gene *eae* na ilha de patogenicidade chamada de “*locus enterocyte effacement*” (MCDANIEL et al., 1995). Esse gene codifica proteína chamada intimina, que é responsável pela junção íntima de EPEC às células epiteliais (JERSE et al., 1990). Essa proteína também é encontrada em EHEC. A adesão destas linhagens está associada ao plasmídeo EAF que codifica pili do tipo IV denominado BFP (bundle-forming pilus), que estabilizam a bactéria em microcolônias (NATARO e KAPER, 1998). As linhagens EPEC típicas possuem o gene *eae* e o plasmídeo EAF. As estirpes atípicas detêm somente o gene *eae* (TRABULSI et al., 2002).

Os humanos são reconhecidos como único reservatório das EPEC típicas, pois raramente são encontradas em animais. Indivíduos portadores se constituem nas fontes de infecção e as vias de transmissão incluem contato direto e ingestão de água e alimentos contaminados pelas fezes (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

As ETEC causam diarreia aquosa, leve a severa. São responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de diarreia em crianças com menos de cinco anos, bem como é o principal agente da “diarreia dos viajantes” (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Esta classe produz fímbrias de colonização e dois tipos principais de enterotoxinas denominadas toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). As ETEC podem produzir somente LT e/ou ST. As LTs são enterotoxinas parecidas com a toxina colérica, produzida pelo *Vibrio cholerae*. Essa toxina altera a atividade da adenilciclase ativando canais de cloro, levando à saída de

água e à diarreia. LT é encontrada predominantemente em isolados humanos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). As STs são divididas em STa e STb, codificadas em plasmídio e diferem na estrutura e no mecanismo de ação. A toxina STa é associada à doença em humanos. Após a ligação da toxina com o receptor guanilil-ciclase, ocorre estimulação da atividade de guanil-ciclase, levando ao aumento intracelular de cGMP que determina aumento nas secreções. A STb é associada a doenças em animais. Essa toxina eleva a concentração citosólica de  $Ca^{+2}$  estimulando a liberação de prostaglandina  $E_2$  e liberação de serotonina, levando ao aumento na secreção de íons e diarreia (SEARS e KAPER, 1996).

EIEC possui propriedades bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes à toxina produzida pelo gênero *Shigella*. A EIEC penetra nas células epiteliais do cólon, se multiplica e invade as células adjacentes causando inflamação e sinais de diarreia aquosa, com presença de muco e sangue, febre, mal estar e cólica. A infecção por EIEC é mais freqüente em crianças com mais de dois anos de idade e em adultos. A transmissão é via fecal-oral e ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados. Os humanos são reservatórios desta categoria de *E. coli* diarreiogênica (VERONESI e FOCACCIA, 2005). Os genes requeridos para a patogenicidade de EIEC estão presentes em plasmídio que codifica um sistema de secreção do tipo III, responsável pela secreção das proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpgD. Estas proteínas determinam rearranjos no citoesqueleto e lise dos vacúolos endocíticos dos enterócitos (SANSONETTI, 2002).

*E. coli* enteroagregativas causam diarreia em crianças e adultos e se caracterizam padrão de adesão às células epiteliais semelhante a “tijolos empilhados” (KAPER et al., 2004). Atualmente, EAEC são definidas por *E. coli* que não secretam LT ou ST e aderem em células HEp-2. Esta categoria produz a toxina termoestável EAST-1 e a “plasmid-encoded toxin” (PET). A EAST-1 altera a corrente iônica das células intestinais, enquanto que a PET induz o rompimento da membrana celular. A colonização ocorre predominantemente no cólon, seguida por secreção de enterotoxinas e citotoxinas. Clinicamente caracteriza-se por diarreia aquosa, com curto período de incubação, febre branda e vômitos. A “diarreia do viajante” também tem sido associada com esta categoria de *E. coli* diarreiogênica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Linhagens de EAEC foram isoladas de equinos, cães, macacos, bovinos e suínos, porém ainda não foi estabelecido o papel dos animais como reservatórios para humanos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Linhagens DAEC são caracterizadas por padrão agregativo celular. Causam diarreia em crianças com mais de um ano de idade. Produzem fímbria denominada F1845 responsável por ação citopática, determinando o alongamento das microvilosidades ao redor da célula bacteriana, reduzindo a borda em escova da mucosa intestinal (SCALETSKY et al., 2002). DAEC também têm sido encontrada em infecções do trato urinário (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

*E. coli* EHEC sorotipo O157:H7 é reconhecida como causa emergente de doença entérica e insuficiência renal (síndrome urêmica) em humanos (TAUXE, 1997). Esta classe possui citotoxinas (GRIFFIN e TAUXE, 1991), plasmídios e fatores de colonização (JUNKIS e DOYLE, 1989). No entanto, o mecanismo de patogenicidade ainda não está completamente esclarecido. O sorotipo O157:H7 inibe a síntese protéica, produz efeito citopático “in vitro” em células Vero - também denominadas de verotoxinas-VTs ou *Shiga-like* toxinas (STX) [LEVINE, 1987] - e altera fatores de coagulação sanguínea. Também causa lesão A/E (“attaching and effacing”) e colonizam preferencialmente o cólon (VERONESI e FOCACCIA, 2005). A infecção pelo sorotipo O157:H7 culmina com grave quadro de colite hemorrágica, trombocitopenia e síndrome urêmica hemolítica, freqüentemente fatal em crianças e indivíduos debilitados (TAUXE, 1997).

A espécie bovina é reconhecida como a principal fonte de infecção do sorotipo O157:H7, que é eliminado pelas fezes de bovinos com e sem sinais entéricos (FAITH et al., 1996).

Os humanos apresentam inicialmente forte dor abdominal e febre, seguido de disenteria, emese e desidratação (DOYLE, 1991). A doença pode evoluir para grave comprometimento renal ou síndrome urêmica hemolítica (HUS), provocada por lesões no endotélio vascular renal decorrente da ação das VTs. Em crianças com menos de dez anos, a doença é altamente letal. Dentre as crianças que se recuperam, aproximadamente 12% apresentam seqüelas renais, hipertensão e/ou sinais neurológicos (TARR, 1995).

As infecções humanas estão relacionadas ao consumo de carne crua ou sem cocção adequada – principalmente de origem bovina – ou ingestão de água, leite e derivados, além de diversas variedades de frutas e verduras contaminadas por microrganismos de origem fecal (TARR, 1995; TAUXE, 1997). Cães (JOHNSON, 1991; VON SYDOW e DEL, 2005) e gatos (BUSCH et al, 2007) também já foram descritos acometidos por *E. coli* O157:H7 verotoxigênicas, denotando também o risco dos animais de companhia na transmissão desse sorotipo.

No Brasil, Cerqueira et al. (1999) notificaram pela primeira vez o sorotipo nas fezes de bovinos em abatedouros no Rio de Janeiro. Estudos subseqüentes investigaram o sorotipo O157:H7 em leite bovino (RIBEIRO et al., 2006), e em casos de infecção entérica e renal em crianças (DE SOUZA et al., 2007).

As infecções extra-intestinais (IEs) por *E. coli* em humanos ocorrem em todas as faixas etárias e podem acometer diversos órgãos. Como IEs típicas merecem destaque as ITUs por *E. coli* uropatogênicas (UPEC), meningite/ou septicemia (MNEC) especialmente em neonatos, infecções intra-abdominais, pneumonia, osteomielite e infecções em tecidos moles (KAPER et al., 2004).

Diferentes fatores de virulência de *E. coli* tem sido investigados em linhagens entéricas e extra-entericas. Dentre estas propriedades de virulência assumem destaque as adesinas, fímbrias, citotoxinas e mecanismos quelantes de ferro. Adesinas são proteínas localizadas na superfície bacteriana, que promovem a ligação específica com receptores presentes em células eucarióticas, determinada por estruturas protéicas denominadas fímbrias, pili ou por adesinas não fimbriais. As fímbrias são compostas por proteínas “ancoradas” dentro da membrana da bactéria (CAPITANI et al., 2006).

A fímbria do tipo P é codificada pelo gene *pap* que está localizado no cromossomo bacteriano de *E. coli* extraintestinal. Cerca de seis dentre 11 genes codificam a proteína: PapA, PapH, PapK, PapE, PapF e PapG. Na porção distal da fibrila, encontra-se a adesina PapG formada por três outras subunidades menores denominadas PapE, PapF e PapK, ligadas a uma estrutura rígida, que é composta por repetidas subunidade PapA. A subunidade PapH é ancorada pela subunidade PapA no interior da membrana (MULVEY, 2002).

Existem três variantes moleculares da PapG conhecidas como Classe I, II e III. O alelo *papGI* é encontrado em isolados de fezes. O alelo *papGII* está associado a pielonefrite e o alelo *papGIII* é encontrando predominantemente em isolados de cistite (BERGSTEN et al., 2005).

A fímbria S é similar às fímbrias do tipo 1 e à fímbria P, organizados no operon *sfa*. A fímbria S é composta por uma subunidade maior, SfaA, e três subunidades menores: SfaG, SfaH e SfaS. Linhagens que expressam essa fímbria estão associadas a casos de septicemia, meningite neonatal e pielonefrite (MULVEY, 2002).

Entre 1984 e 1989 três novos grupos de adesinas foram identificados: adesina Dr, adesina afimbrial (Afa1 e Afa3) e F1845 (NOWICKI et al., 2001). Nowicki et al. (1990) demonstraram que estas adesinas possuíam como receptor comum o antígeno do grupo sanguíneo Dr, denominado DAF – Decay Accelerating Factor. Esse antígeno protege o tecido do hospedeiro dos danos do sistema complemento. Esse receptor está amplamente distribuído pelas mucosas gastrintestinais, uretra e bexiga. Atualmente esta adesina é denominada hemaglutinina Dr, que apresenta hemaglutinação resistente a manose (HMR). As adesinas da família Dr provavelmente facilitam a colonização ascendente e a infecção do trato urinário.

A adesina afimbrial Afa foi identificada em linhagens uropatogênicas que exibiam hemaglutininas resistente a manose (HMR). O operon *afa* possui similaridade com outros membros das adesinas Dr. São conhecidos pelo menos seis genes envolvidos na biogênese da adesina: *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *afaE* e *afaF*. As adesinas afimbriais estão relacionadas a afecções urinárias e septicemias principalmente em humanos (GARCIA et al., 2000).

Paton et al. (2001) descreveram nova adesina plasmidial autoaglutinante denominada Saa em linhagem de *E. coli* verotoxigênica responsável por surto de síndrome urêmica hemolítica (HUS). O gene *saa* está relacionado a genes codificadores de enterohemolisinas e foi detectado em isolados de STEC em humanos (PATON et al., 2001; PATON e PATON, 2002). Estudos da presença do gene *saa* em isolados de STEC de pacientes com HUS, com diarreia severa, indivíduos assintomáticos e bovinos saudáveis, detectaram o gene mais freqüentemente nas linhagens de bovinos, sugerindo que esta adesina possa

ser importante na aderência bacteriana à mucosa intestinal de bovinos (JENKINS et al., 2003).

As linhagens de *E. coli* produzem vários tipos de citotoxinas. A descrição de CNF em humanos está relacionada a distúrbios entéricos, infecções do trato urinário e septicemias. Linhagens necrotoxigênicas estão estreitamente associadas às infecções extra-intestinais, principalmente em isolados produtores de hemolisinas (SUSSMAN, 1997). Em células HeLa, o CNF-1 induz extensa multinucleação, alongamento e morte celular, além de moderada necrose na pele de coelhos. CNF-2 causa moderada multinucleação e alongamento celular, e extensa necrose na pele de coelho (DE RYCKE et al., 1990). O CNF-1 é codificado por um único gene de 3042pb localizado no cromossomo bacteriano. O gene *cnf1* pertence à ilha de patogenicidade (PAI) na maioria das UPECs. O gene *hly* codifica a toxina hemolisina, sugerindo que essas toxinas possam agir conjuntamente na virulência da bactéria (BOQUET, 2001).

À semelhança do CNF, as linhagens hemolíticas predominam em afecções extraintestinais, tais como infecções do trato urinário, peritonite, apendicite, septicemia e meningite neonatal. Essa toxina forma poros na membrana de células. Possui capacidade de lisar eritrócitos, leucócitos, granulócitos, fibroblastos e células uroepiteliais. A lise de eritrócitos aumenta a disponibilidade do íon ferro para o microrganismo, e é provocada em altas concentrações da  $\alpha$ -hly. Em baixas concentrações é lítica para leucócitos, monócitos e linfócitos T periféricos. A síntese, a maturação e a secreção da  $\alpha$ -hly são determinadas pelo operon *hlyCABD*. O operon codifica as proteínas HlyA, HlyB, HlyC e HlyD, que estão envolvidas na lise das células (ISLAND et al., 1998).

O ferro é elemento essencial para a multiplicação bacteriana. A disponibilidade desse íon é limitada, encontrado intracelularmente nas proteínas heme e em pequena quantidade no meio extracelular (RUSSO et al., 2002). *E. coli* possui vários mecanismos envolvidos na aquisição de ferro, como a síntese de sideróforos, que são quelantes de ferro. A aerobactina é um sideróforo produzido em condições de baixa disponibilidade de ferro nos fluidos corpóreos e nos tecidos de vertebrados. Este fator de virulência está associado

a infecções extraintestinais em seres humanos e animais domésticos, em virtude de capturar o ferro da transferrina (TORRES et al., 2001).

Os genes que codificam a aerobactina podem estar localizados tanto em plasmídios como no cromossomo bacteriano. O operon da aerobactina é composto por cinco genes *iucABCD* e *iutA*, dos quais quatro genes (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e o *iutA* (TIBA, 2004).

A aerobactina comumente é encontrada em humanos com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%) e, secundariamente, em pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou em estirpes fecais (41%), denotando a maior participação deste fator de virulência nas infecções extra-intestinais, particularmente das vias urinárias (GARCIA e LE BOUQUÉNEC, 1996).

Hayashi et al. (1992) analisaram microbiologicamente amostras de areia de parques públicos no Japão, encontrando maior número de enteropatógenos nos meses de abril a junho e de setembro a outubro (*E. coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp.), e afirmaram que estes locais são de risco para infecção de crianças. Na Holanda, Heuvelink et al. (2002) relataram caso de criança que apresentou sinais de HUS por *E. coli* verotoxigênica após visita a fazenda de criação de ovinos e caprinos.

Bonilla et al. (2007) compararam a contaminação microbiológica de amostras de areia de praia e água do mar no sul da Flórida, e encontraram maior concentração de bactérias fecais na areia do que na água. Beversdorf et al. (2007) investigaram *E. coli* em amostras de areia de praia nos EUA, e o valor médio diário de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi entre 6.700 a 40.900/100g de areia.

Até o momento, não existem padrões sanitários oficiais de qualidade da areia de praças ou parques, quais sejam microbiológicos, parasitológicos e/ou virológicos, que estabeleçam limites quantitativos e/ou qualitativos no Brasil.

## **2.3 SALMONELOSE**

A salmonelose é considerada uma das principais zoonoses em todo o mundo. O microrganismo é ubíquo e acarreta diversas afecções em humanos e animais. A taxonomia é motivo de controvérsia entre os bacteriologistas em

virtude da co-existência de classificação sorológica e, recentemente, molecular. Aceita-se a existência de duas espécies, *Salmonella enterica* (patogênica) e *S. bongori* (saprófita). *S. enterica* é a espécie de maior importância contendo vários sorotipos, que têm sido relacionados principalmente a manifestações de gastroenterite, pneumonia, septicemia e, eventualmente, a abortamentos nos animais e humanos (ACHA e SZYFRES, 2003).

Nos humanos, o microrganismo está geralmente relacionado às infecções e toxinfecções alimentares decorrentes principalmente do consumo de produtos de origem animal. A principal forma de transmissão da bactéria para os humanos ocorre pela via fecal-oral por contaminação de água e utensílios, levando a gastroenterite severa, ocasionalmente fatal. As manifestações clínicas da doença incluem febre, forte dor abdominal, episódios de vômito e diarreia com estrias de sangue, mialgias e sinais de desidratação (ACHA e SZYFRES, 2003).

O microrganismo é eliminado pelas fezes e possui elevada resistência ambiental, especialmente em ambientes úmidos ao abrigo da luz solar direta. Diferentes espécies de animais e inclusive humanos podem albergar a bactéria no intestino, com eliminação intermitente pelas fezes. Os cães, gatos e animais de produção são considerados, epidemiologicamente, como importantes fontes de infecção. Podem eliminar o agente pelas fezes, com e sem sinais entéricos, e se infectar por diferentes sorotipos. Os animais também se infectam pelo consumo de alimentos e água contaminados por fezes ou pelo hábito da coprofagia. O estreito contato entre as crianças e os animais de companhia, somados aos hábitos precários de higiene em crianças favorecem as infecções pelo gênero *Salmonella*. A salmonelose é motivo de grande preocupação entre os profissionais da área de saúde, principalmente em crianças abaixo dos quatro anos de idade (SCHUTZE et al., 1999; TREVEJO et al., 2003).

Diferentes enteropatógenos têm sido apontados como agentes de doenças emergentes em humanos, entre eles *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis (ALTEKRUSE et al., 1997). No Brasil, Ribeiro et al. (2003) relataram caso de gastroenterite, septicemia e falha renal por *S. Enteritidis* em cão domiciliado, e ressaltaram os riscos de convívio entre os cães e humanos na transmissão desta zoonose. Recentemente, foram descritos os sorotipos Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Agona, Newport e Glostrup, isolados de cães,

bovinos e eqüinos no país e salientado para a similaridade dos sorotipos encontrados na salmonelose em animais e humanos (RIBEIRO et al., 2010).

Em outros países, diferentes estudos têm investigado a contaminação do ambiente dos humanos por *Salmonella* sp. Holley et al. (2006) simularam experimentalmente a temperatura das diferentes estações do ano, e observaram que a bactéria foi isolada por período maior ou igual a 180 dias em solos contendo matéria orgânica, particularmente em condições com maior umidade e esterco de origem animal.

Eumanama et al. (2005) compararam a qualidade microbiológica de areia de praia e água do mar da Faixa de Gaza, e encontraram alta quantidade de coliformes fecais, *Salmonella* sp., entre outros enteropatógenos, tanto na areia quanto na água. Foi destacado que, neste local, indivíduos menores de 15 anos são impedidos de brincarem na areia devido à maior susceptibilidade dessa faixa etária a gastroenterites bacterianas.

Doorduyn et al. (2006), nos países baixos, aplicaram inquérito epidemiológico a pacientes que apresentaram gastroenterite por *Salmonella* sp visando investigar os fatores de risco relacionados à transmissão do microrganismo. Dentre 1194 casos, 37% foram causados por *S. Enteritidis* e 37% por *S. Typhimurium*. Ambos sorotipos tiveram maior ocorrência em crianças com até 4 anos e menor em crianças entre 5 e 17 anos, com predomínio no período de verão. *S. Typhimurium* apresentou maior ocorrência em áreas rurais. Neste estudo, os principais fatores de risco relacionados às infecções por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram o consumo de alimentos crus de origem animal, o contato de crianças entre 4 e 12 anos com caixas de areia e o uso indevido de antimicrobianos. O contato com caixas de areia foi o principal fator de risco para ocorrência de *S. Typhimurium*.

## **2.4 TOXOPLASMOSE**

A toxoplasmose é a zoonose parasitária cosmopolita mais comum que acomete humanos e animais homeotérmicos. O coccídeo *T. gondii* pertence à família *Sarcocystidae* e é reconhecido como protozoário intracelular obrigatório (ACHA e SZYFRES, 2003).

*T. gondii* é a única espécie reconhecida do gênero, embora sejam descritas variantes genotípicas na ocorrência da doença em animais de produção, de companhia, aves e humanos. A toxoplasmose é caracterizada pelas fases aguda e crônica. Na fase aguda, o parasita se dissemina pelos tecidos do hospedeiro, enquanto que na fase crônica persiste no interior de cistos localizados na musculatura e no sistema nervoso central (SNC) [SILVA et al., 2005].

O protozoário possui três estágios principais de desenvolvimento: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção e possui multiplicação rápida no interior das células, incluindo células do sistema fagocítico mononuclear, hepáticas, pulmonares, nervosas, da submucosa e musculares. Os bradizoítos se constituem na forma de multiplicação lenta, encontrados no interior de cistos localizados predominantemente no SNC, globo ocular, musculatura esquelética e cardíaca. O oocisto é a forma eliminada pelas fezes do hospedeiro definitivo, representado pelos felídeos, em especial o gato doméstico. O oocisto possui uma parede externa dupla que confere alta resistência ao parasita às condições ambientais (DUBEY, 1994).

Os felídeos são os únicos animais que completam a fase sexuada do parasita, a qual leva à excreção de oocistos nas fezes. Este padrão de multiplicação denomina-se ciclo enteroepitelial. Os felídeos se infectam após ingestão de hospedeiros intermediários infectados com *T. gondii* ou oocistos esporulados do ambiente. A eliminação de oocistos nas fezes ocorre durante 7 a 15 dias pós-infecção. Em torno de 2 a 5 dias esporulam e tornam-se infectantes em condições favoráveis de pH, temperatura e umidade, podendo permanecer viáveis na água e solo durante meses (GREENE, 2006).

Os animais e humanos podem se infectar pelas três formas do ciclo de vida de *T. gondii*: ingestão de oocistos infectantes eliminados nas fezes de felídeos, de cistos presentes em tecidos de hospedeiros intermediários, além de taquizoítos que podem estar presentes em leite não pasteurizado (TENTER, 1999). Além disso, em humanos a infecção por taquizoítos pode ocorrer por via transplacentária e, ocasionalmente, em transplantes de órgãos e transfusões sanguíneas (SUBAUSTE e REMINGTON, 1997).

Os hospedeiros intermediários (animais e humanos) se infectam após a ingestão dos oocistos ou cistos. Os taquizoítos se multiplicam rapidamente por brotamento, provocando a lise celular, disseminando-se pelos vasos linfáticos e sistema porta, com subsequente invasão de vários órgãos e tecidos. Em infecções maciças, os taquizoítos podem produzir áreas de necrose em órgãos vitais, como miocárdio, pulmões, fígado e cérebro. Durante esta fase, o hospedeiro pode apresentar febre e linfadenopatia. Com o desenvolvimento da resposta imune, a maior parte dos taquizoítos é destruída. Entretanto, são formados cistos, sobretudo em locais pouco acessíveis às imunoglobulinas circulantes, como sistema nervoso central, globo ocular e músculo estriado, caracterizando a fase usualmente assintomática, com tendência a cronicidade. Após esta fase, os susceptíveis tornam-se persistentemente infectados (ACHA e SZYFRES, 2003; GREENE, 2006).

A principal forma de transmissão da toxoplasmose para os humanos ocorre pela ingestão de água e alimentos (frutas, verduras e legumes crus) contendo oocistos esporulados, ou cistos teciduais presentes em carne contaminada e mal cozida. Em adultos, o período de incubação varia de 10 a 23 dias após a ingestão de carnes mal cozidas, e de 5 a 20 dias após ingestão de oocistos do ambiente. Para os animais domésticos, a transmissão ocorre pela ingestão de alimento com cistos ou água contaminada por oocistos esporulados (MACEDO, 1994). Na forma congênita, *T. gondii* multiplica-se na placenta e difunde-se para os tecidos fetais. Embora a infecção possa se desenvolver durante qualquer estágio da gestação, o feto é afetado de forma severa quando a gestante se infecta durante a primeira metade da gestação (DUBEY, 1994).

No Brasil ocorreu o maior surto de toxoplasmose descrito em todo mundo, no município de Santa Isabel do Ivaí, PR, entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, no qual 462 pessoas apresentaram reação sorológica para toxoplasmose. Estudo epidemiológico com 156 pessoas que apresentaram sinais da doença (cefaléia, febre, cansaço, fraqueza, mialgia, linfadenomegalia), revelou que sete destas eram gestantes e seis tiveram seus filhos infectados, manifestando anomalias congênitas graves e um abortamento espontâneo. A provável fonte de contágio foi o reservatório de água da cidade

que estava contaminado com fezes de gatos contendo oocistos de *T. gondii* (FUNASA, 2002).

A toxoplasmose congênita apresenta altas taxas de morbimortalidade. No Brasil estima-se que anualmente cerca de 60.000 crianças sejam acometidas pela doença. O risco médio de transmissão transplacentária é de 30%. A gravidade para o feto é inversamente proporcional à idade gestacional (MACEDO, 1994). As principais manifestações neurológicas pós-natais são microcefalia, hidrocefalia, calcificações intracerebrais, coriorretinite, surdez e retardo mental (PRATLONG et al., 1994).

Os felinos são fundamentais para a manutenção do ciclo biológico da toxoplasmose. A infecção de gatos domésticos pela ingestão de cistos ocorre principalmente nos animais errantes ou domésticos que tenham hábitos de se alimentar fora de casa (semidomiciliados), e que possuem hábito de caçar. Os gatos errantes defecam em todo ambiente dificultando o controle. Sugere-se que os gatos errantes e semidomiciliados sejam determinantes na transmissão da toxoplasmose, e que deveriam ser controlados por medidas legais que reduzissem a intensidade da disseminação do parasita, principalmente em ambientes urbanos. Com efeito, a contaminação por fezes de gatos em areia/solo de parques, praças e ambientes recreacionais assume risco importante na transmissão da toxoplasmose, particularmente para crianças, pacientes com algum grau de imunossupressão e mulheres gestantes (FRENKEL, 2000).

Pena et al. (2006), no município de São Paulo, encontraram oocistos de *T. gondii* em amostras de fezes em três (1,3%) dentre 237 gatos. Meireles et al. (2004) compararam a soroprevalência entre cães e gatos semidomiciliados pelo método de ELISA, e encontraram anticorpos em 40% dos gatos e 50,5% dos cães, mostrando o impacto da infecção pelo parasito na cidade de São Paulo.

O Brasil possui índices de toxoplasmose que estão entre os mais altos descritos na literatura. Contudo, não existe no país programa de controle oficial ou de vigilância epidemiológica específica para a doença (MELAMED, 1982). Ademais, pouca atenção tem sido dada à contaminação do ambiente dos humanos na veiculação do parasita.

## 2.5 LARVA MIGRANS VISCERAL/OCULAR

Larva migrans visceral é reconhecida como importante zoonose causada por migração errática de estágios larvais de parasitas intestinais do gênero *Toxocara*, especialmente *T. canis*, cujo hospedeiro definitivo é o cão. Em cães e gatos a doença é causada por *T. canis* e *T. cati*, respectivamente (COELHO et al., 2001).

O cão se infecta após a ingestão de ovos embrionados de *T. canis*, que após liberação das larvas no intestino delgado atravessam a parede intestinal e, pela veia porta e vasos linfáticos, se disseminam para fígado, coração e pulmões. Nos pulmões, as larvas rompem os bronquíolos e alcançam a traquéia, quando são deglutidas e retornam ao intestino delgado, onde se desenvolvem até a forma adulta. A eliminação dos ovos nas fezes do cão pelas fêmeas adultas do parasito ocorre após 21 dias da ingestão dos ovos. Podem ser eliminados até 200.000 ovos por dia, que se tornam infectantes em duas a cinco semanas, sob condições ambientais adequadas de temperatura e umidade (SCHANTZ, 1989). Essa forma de migração denomina-se hepato-traqueal e ocorre em cães filhotes com menos de cinco meses de idade, visto que ainda não possuem resposta imunológica eficiente. Aos seis meses, os cães apresentam resposta imunológica adquirida contra o parasito. Nestes animais, as larvas que passam pelos pulmões retornam ao coração, e se disseminam para rins, fígado, olhos e cérebro, onde permanecem em estado de hipobiose (BARRIGA, 1988). Esse tipo de migração também ocorre nos cães após ingestão de larvas infectantes em hipobiose dos tecidos de hospedeiros paratênicos, como roedores e aves (NUNES, 1995).

A infecção também pode ocorrer nos filhotes por via transplacentária ou mamária. Pela via transplacentária, as larvas em hipobiose nos tecidos da cadela são ativadas, provavelmente por alterações hormonais no terço final da gestação, e alcançam o fígado dos fetos pela placenta. Os filhotes nascem com as larvas nos pulmões e, a partir da segunda semana de vida, ovos podem ser eliminados por parasitos adultos no intestino. As larvas podem alcançar as glândulas mamárias e serem transmitidas desde a ingestão do colostro até 45

dias da lactação, com eliminação de ovos nas fezes dos filhotes após duas semanas da ingestão da larva pelo leite (BARRIGA, 1988).

As cadelas em puerpério são capazes de se infectar pela ingestão de parasitos adultos pelo conteúdo de vômito e ovos nas fezes dos filhotes, durante a higienização da ninhada (NUNES, 1995).

Crianças na faixa etária de um a cinco anos infectam-se ao ingerirem ovos embrionados do parasito pelo hábito de geofagia ou onicofagia. Ao eclodir, as larvas atravessam a parede do intestino delgado e iniciam migração pela via linfática ou circulação portal para diversos órgãos, principalmente fígado e pulmões, podendo atingir coração, globo ocular e sistema nervoso central (COELHO et al., 2001). As infecções mais graves são aquelas que acometem o globo ocular e sistema nervoso central (BACHLI et al. 2004). A forma larval ocular (Larva Migrans Ocular) em crianças ocorre de forma uni ou bilateral (ABE-JACOB et al., 1991). Adultos também podem ser acometidos apresentando quadro clínico de conjuntivite, endoftalmite, estrabismo, leucocoria, granuloma periférico da retina e perda da visão (OVERGAAUW, 1997). As manifestações clínicas da larva migrans visceral são astenia crônica, convulsões, pneumonia, tosse, insuficiência respiratória, febre, dor abdominal difusa, arterite, nefrite, miocardite, meningite, meningoencefalite e meningoradiculite (HAMIDOU et al., 2002, ABE et al., 2002, ROBINSON et al., 2002).

Epidemiologicamente é importante ressaltar que o livre acesso de cães e gatos a locais de recreação propiciam a contaminação do solo. Devido à consistência da cutícula externa, os ovos permanecem viáveis por vários meses no ambiente, expondo continuamente a população humana ao risco de infecção e desenvolvimento da doença (SANTARÉM et al., 1998). A ingestão de carne crua de hospedeiros paratênicos, principalmente de ovinos (SALEM e SCHANTZ, 1992) e frangos (MORIMATSU et al., 2006) também é considerada fator de risco na transmissão da toxocaríase.

Espinoza et al. (2003) estudaram a soroprevalência da doença em Lima, Peru, em pacientes com sinais oculares sugestivos de toxocaríase e obtiveram 55,6% de indivíduos reagentes.

Wiwanitkit e Waenlor (2004) avaliaram amostras de areia de praças públicas em Bangkok, Tailândia, e detectaram 5,71% de amostras positivas

para ovos de *Toxocara* sp. Os autores concluíram que a toxocaríase deve ser controlada conjuntamente à população de cães e gatos errantes e semidomiciliados. Talvik et al. (2006) analisaram 454 amostras de fezes e areia de parques em Tartu, Estônia, e observaram 17,8% de amostras de areia positivas para ovos de *Toxocara* sp. Fezes de gatos foram encontradas em 21 amostras de areia. Ademais, foi realizada necropsia para identificação de parasitos adultos em 41 cães e 27 gatos eutanasiados, que apresentaram 14,6% de *T. canis* e 48,2% de *T. cati*, respectivamente. Os autores alertaram que as crianças são o maior grupo de risco na transmissão ambiental desta zoonose e que os gatos são tão importantes quanto os cães na disseminação do parasito.

No Brasil, Costa-Cruz et al. (1994) estudaram a freqüência de contaminação de praças públicas de Uberlândia, MG, por ovos de *Toxocara* sp. em amostras de areia e encontraram o parasita em 23% da amostragem. Em Santa Maria, RS, estudo similar identificou o parasita em 91,7% de praças e parques de recreação (Corrêa et al., 1995). Santarém et al. (1998) também encontraram ovos de *Toxocara* sp. em 17,5% de amostras de areia de parques e praças públicas de Botucatu, SP, predominantemente nos meses de primavera e verão. Araujo et al. (1999) avaliaram setenta e quatro praças públicas em Campo Grande, MS, e encontraram ovos de *Toxocara* sp. em oito (10,8%) praças. Coelho et al. (2001), em Sorocaba, SP, investigaram a presença de ovos de *Toxocara* sp. em trinta praças, tendo recuperado o parasita em dezesseis (53,3%).

## 2.6 CORONAVIROSE

Os vírus da família *Coronaviridae* estão classificados na ordem *Nidovirales* e são subdivididos em três sorogrupos (grupos I, II, III). Dentro desses grupos, são classificados com base no hospedeiro natural, reações sorológicas e técnicas moleculares (FLORES, 2007).

O grupo I está envolvido em manifestações entéricas e respiratórias em suínos, gastroenterite em cães e peritonite em felinos. O grupo II causa resfriado em humanos, encefalite e gastroenterite em suínos, hepatite em

camundongos e sinais de enterite em bovinos e perus. O grupo III provoca traqueobronquite e nefrite em aves (FLORES, 2007).

Os *Coronavirus* são vírus RNA envelopados. Possuem o maior genoma conhecido entre os vírus RNA. Os vírions possuem forma esférica, entre 80 a 120 nm, circundados por projeções externas de aproximadamente 20 nm de extensão, que conferem à partícula viral aparência similar a uma coroa. Essas projeções externas são formadas pelas glicoproteínas S da superfície do envelope viral, responsáveis pela ligação dos vírions aos receptores celulares, a fusão do envelope com a membrana plasmática e apresentam sítios antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes (QUINN et al., 2005).

Este grupo de vírus são facilmente inativados por solventes lipídicos, agentes oxidantes, formaldeído, detergentes e desinfetantes comuns. Apresentam grande sensibilidade ao calor e estabilidade ao pH ácido, e podem se manter estáveis em pH 3 (GREENE, 2006). Gundy et al. (2009) avaliaram a sobrevivência do coronavírus em água parada e água de esgoto a 4°C e 23°C, e observaram presença de partículas virais viáveis por mais de 100 dias na água a 4°C, 10 dias na água a 23°C e entre 2 a 4 dias na água de esgoto.

O gênero *Coronavirus* apresenta complexo mecanismo de replicação viral, que inclui a produção de RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos, gerando alta frequência de recombinações, grande variação antigênica e a existência de vários sorotipos. Além disso, os coronavírus sofrem mutações freqüentes no seu genoma, decorrentes de erros cometidos pela RNA polimerase e deleções no genoma de vírus preexistentes (FLORES, 2007).

O ciclo replicativo dos coronavírus consiste na ligação dos vírions pela glicoproteína S aos receptores celulares e internalização por endocitose. O genoma é liberado no citoplasma e a enzima polimerase é produzida, iniciando a síntese da cópia antígenômica e dos mRNAs subgenômicos. Em seguida, os mRNAs subgenômicos são traduzidos em proteínas estruturais e ocorre a síntese do RNA genômico que, posteriormente, será conjugado às proteínas do nucleocapsídeo. Após o brotamento do nucleocapsídeo no retículo endoplasmático rugoso ou do complexo de Golgi, a progênie viral é transportada em vesículas até a membrana plasmática e o egresso das

partículas virais ocorre por exocitose, culminando com a morte celular e infecção de novas células (SAWICKI et al., 2007).

Os coronavírus podem infectar várias espécies de mamíferos e de aves. Apresentam tropismo por células epiteliais intestinais e respiratórias. As infecções podem ser graves em animais jovens e nos adultos, mas geralmente são brandas ou inaparentes (QUINN et al., 2005).

O interesse por essa família aumentou recentemente com a classificação de um novo coronavírus humano, o vírus da pneumonia asiática (SARS-COV). Antes do aparecimento deste coronavírus nos humanos, os patógenos deste gênero estavam relacionados principalmente a resfriados de evolução benigna (FLORES, 2007). Os coronavírus não são estritamente espécie-específicos e são capazes de infectar novas espécies. Desta forma, se aventa a possibilidade de infecções cruzadas entre animais e humanos. Cuidados gerais de higiene quando da manipulação de animais doentes e de suas excreções são recomendados na profilaxia da coronavirose (GREENE, 2006).

## 2.7 ROTAVIROSE

Os rotavírus são reconhecidos mundialmente como um dos principais vírus entéricos para humanos e animais. Estão amplamente distribuídos na natureza e acometem grande diversidade de hospedeiros, incluindo mamíferos domésticos, silvestres e as aves (ACHA e SZYFRES, 2003).

As partículas virais quando observadas na microscopia eletrônica apresentam aparência de roda, fato que motivou a denominação *Rotavirus*. Os vírions medem cerca de 85 nm de diâmetro e não possuem envelope. São os únicos vírus de mamíferos e aves que possuem 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) no genoma e com diferentes tamanhos. A diferença de tamanho permite observar perfil de migração único dos segmentos genômicos para os rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Cada segmento codifica pelo menos uma proteína viral, totalizando seis proteínas estruturais e seis não-estruturais. O segmento 11 do genoma é o único que codifica mais de uma proteína. No núcleo viral, estão presentes as proteínas VP1, VP2 e VP3. No capsídeo intermediário localiza-se a VP6 e, no capsídeo externo, a VP4 e VP7 (QUINN et al., 2005).

Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos, designados pelas letras A a G, segundo diferenças antigênicas da proteína VP6, como também pelo padrão eletroforético de migração dos 11 segmentos genômicos. Os grupos A, B e C são encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto os grupos D a G são identificados exclusivamente em animais. As proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 permitem também a caracterização do vírus em sorotipos e/ou genótipos. Dessa forma, o rotavírus possui sistema binário de classificação, constituído por tipos de VP4 e tipos de VP7. Atualmente são reconhecidos mais de 27 diferentes tipos de VP4 e VP7 e mais de 405 combinações possíveis entre os diferentes genótipos (ACHA e SZYFRES, 2003; FLORES, 2007).

Os rotavírus mantêm a infectividade em pH entre 3 e 9. São relativamente estáveis em condições ambientais e podem se manter viáveis por meses nas fezes. Resistem ao éter e clorofórmio, porém são sensíveis a formalina, cloro, betapropiolactona, etanol (95%) e glutaraldeído (GREENE, 2006). A diversidade antigênica dos rotavírus é decorrente de mutações

pontuais (substituições de aminoácidos das proteínas), de ressortimento (troca de segmentos genômicos por cepas diferentes ao co-infectarem uma célula) e de rearranjos genômicos (deleções ou duplicações em porções de um segmento genômico) (FLORES, 2007).

Os enterócitos dos neonatos são altamente susceptíveis à infecção devido ao desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção de progênie viral. Durante a primeira semana de vida, a doença clínica é incomum pela presença de anticorpos maternos que neutralizam o vírus (RADOSTITS et al., 2007).

Clinicamente as infecções nos animais manifestam-se por diarreia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico e acidose, acometendo principalmente animais jovens durante o primeiro mês de vida, o que acarreta grandes perdas econômicas nas criações comerciais. Em adultos, a infecção geralmente é assintomática, porém podem se tornar portadores e transmitir o vírus para os animais jovens (VERONESI e FOCACCIA, 1996).

A transmissão da rotavirose ocorre via oral-fecal pela água, alimentos e fômites contaminados. Após a ingestão, os vírions penetram nos enterócitos maduros do intestino delgado após interação das proteínas VP4 e VP7 com os receptores celulares. A partícula viral penetra no citoplasma da célula por endocitose ou por penetração direta pela membrana. Em seguida, a transcriptase viral é ativada dando início ao ciclo replicativo. Os virions maduros são liberados por lise celular com descamação do epitélio intestinal, infectando outras células. A reposição celular ocorre por células cubóides da cripta que, embora refratárias à ação viral, são incapazes de exercerem as funções absorptivas. O vírus é excretado nas fezes por até sete dias pós-infecção. A diarreia causada por rotavírus se caracteriza por má absorção e por deficiência da enzima lactase, gerando falha na digestão de lactose. A lactose não digerida entra em fermentação pela ação de bactérias, aumenta a pressão osmótica na luz intestinal, intensificando a diarreia. Após o período de incubação (16 a 24 horas), se observa diarreia de coloração esbranquiçada pela presença de leite não digerido, anorexia, emese, desidratação e acidose metabólica (RADOSTITS et al., 2007).

Os rotavírus são predominantemente espécie-específicos. Entretanto, infecções heterólogas são relatadas com grande frequência. Cepas virais que

são geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas. Ademais, combinações genotípicas comumente associadas com cepas de rotavírus do grupo A de origem humana tem sido identificadas em animais (FLORES, 2007).

As infecções por rotavírus constituem uma das principais causas de morbimortalidade infantil em todo o mundo. Afetam principalmente crianças de até cinco anos de idade, com predomínio entre seis meses a um ano de idade (ACHA e SZYFRES, 2003). Segundo CDC (1991), foram examinadas amostras fecais de crianças dos EUA por um período de 23 meses e 20% das amostras foram positivas para rotavírus, com maior incidência nos meses de inverno.

No Brasil, foram analisadas 557 amostras fecais de crianças hospitalizadas em Goiânia com ou sem gastroenterite. Do grupo de crianças com diarreia foi encontrado 29,2% de amostras positivas, enquanto que no grupo sem diarreia 4,1% foram positivas (CARDOSO et al., 1992).

Considerando o acesso de animais e aves nas praças e parques recreacionais, a geofagia e os precários hábitos de higiene das crianças nos primeiros anos de vida, a veiculação de microrganismos pelo calçado dos usuários e o uso de areia de origem desconhecida são fatores que podem propiciar condições de risco na transmissão de enteropatógenos para os humanos nestes ambientes. Com efeito, o presente estudo teve por objetivo investigar a presença de *E. coli*, *R. equi*, *Salmonella* sp., *T. gondii*, *Toxocara* sp., *Coronavírus* e *Rotavírus* em amostras de areia de praças e parques, públicos e privados, em Botucatu, SP.

### 3 OBJETIVOS

#### Geral:

Avaliar a ocorrência de enteropatógenos como indicadores de contaminação da areia de parques e praças de recreação, bem como investigar marcadores de virulência nos isolados de *E. coli* e *R. equi*.

#### Específicos:

- ✓ Detectar a ocorrência de *R. equi* e a presença de plasmídios associados à virulência nos isolados;
- ✓ Investigar a presença de adesinas, toxinas e sistema de captação de ferro em linhagens de *E. coli* e a ocorrência do sorotipo O157:H7;
- ✓ Avaliar a contagem de coliformes totais e *E. coli* no solo e areia das praças e parques;
- ✓ Determinar a presença do gênero *Salmonella* no ambiente e os sorotipos com potencial zoonótico;
- ✓ Avaliar a presença de ovos de *Toxocara* sp. e oocistos de *T. gondii* no ambiente das praças e parques;
- ✓ Investigar a presença de material genético de *Coronavírus* e *Rotavírus* no ambiente das praças e parques;
- ✓ Comparar os parques e praças de visitação pública ou privada quanto à ocorrência dos diferentes enteropatógenos;
- ✓ Recomendar a adoção de práticas de higienização e controle de acesso de animais, especialmente nos ambientes contaminados.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Descrição do município de colheita**

As amostras de areia utilizadas no estudo foram colhidas no município de Botucatu, localizado na região centro-sul do estado de São Paulo, a 240 Km da capital, com área total de 1.522 Km<sup>2</sup>, a altitude de 840m. A população é estimada em 121.275 habitantes (IBGE, 2006). Segundo estimativas da 38<sup>a</sup> Campanha de Vacinação Anti-rábica realizada pela FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, o município possui ao redor de 20.212 cães e 7.580 gatos, muitos dos quais errantes ou semidomiciliados, perfazendo cerca de um cão para cada seis pessoas e um gato para cada 16 pessoas do município.

### **4.2 Locais e períodos de colheita**

O município possui cerca de sete praças recreacionais públicas com caixas de areia. Foram selecionados aleatoriamente cinco praças públicas e cinco parques privados (creches, escolas e clubes), com autorização dos responsáveis pelos locais, perfazendo dez locais de colheita. As amostras de material do ambiente foram colhidas a cada três meses (fevereiro, maio, agosto e novembro).

### **4.3 Colheita de material**

Amostras de aproximadamente 250g de areia foram colhidas de cinco pontos diferentes de cada local, eqüidistantes de no mínimo cinco metros. As amostras foram colhidas com auxílio de uma colher-de-jardineiro, após a eliminação das sujidades da superfície, a uma profundidade de 5,0 cm e com inclinação de 45 graus (MODIFICADO DE SANTARÉM et al., 1998). Os materiais foram imediatamente acondicionados em sacos plásticos individuais, com fechamento de pressão – utilizados para o congelamento de produtos cárneos – e encaminhados até o laboratório de Doenças Infecciosas da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP. As amostras submetidas a exames microbiológicos e parasitológicos foram mantidas em refrigeração (4-8°C), e processadas, no máximo, em sete dias pós-colheita. Para a pesquisa dos enteropatógenos de origem viral, as amostras foram aliquotadas em sacos plásticos individuais de pressão e mantidas congeladas (-20°C), até o processamento pelas técnicas

moleculares. Desta forma, foram colhidas 50 amostras de praças ou parques recreacionais públicos e igual quantidade de locais privados, a cada três meses, perfazendo 200 amostras avaliadas ao longo de um ano de acompanhamento dos ambientes recreacionais.

#### **4.4 Estoque de linhagens**

Os isolados de *E. coli* e *R. equi* foram mantidos em tubos de vidro vedados com tampa de borracha, no meio de Lignières, em temperatura ambiente (25°C), em duplicata, até o processamento pelas técnicas moleculares para a detecção dos diferentes fatores de virulência.

#### **4.5 Diagnóstico de *R. equi***

##### **4.5.1 Caracterização microbiológica**

*R. equi* foi identificado com base nas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), de cultivo (nos meios de ágar sangue ovino a 5%, desfibrinado, e no meio de NANAT – ácido nalidíxico, novobiocina, actidione e telurito de potássio) – [WOOLCOCK et al., 1979] e bioquímicas do microrganismo, incluindo catalase, oxidase, redução de nitrato, urease e utilização de substratos (glicose, maltose e sacarose), assim como por colorações específicas para ácido-resistência – pelo o método de Ziehl-Nielsen modificado (QUINN et al., 1994; QUINN et al., 2005) –, no laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

##### **4.5.2 Determinação de antígenos e plasmídios de virulência**

A caracterização dos plasmídios associados à virulência (Vap's) foi realizada pelo Dr. Shinji Takai, da Universidade de Kitasato no Japão. Os isolados de *R. equi* foram enviados em tubos de vidro devidamente lacrados, com autorização emitida pelo Serviço de Defesa Animal do MAPA, Brasil, e contendo a permissão de importação do Ministério da Agricultura do Japão.

##### **4.5.2.1 Imunoblotting**

Colônias isoladas de *R. equi* foram semeadas no ágar infusão cérebro-coração, incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 h. Em seguida, foram dispostas em contato com filtro de nitrocelulose (0,45µm), por 5–10 minutos. A

membrana foi removida, seca ao ar, e autoclavada por 105°C, por 60 segundos. O material impregnado na membrana foi submetido à técnica imunoenzimática com anticorpos monoclonais, visando a detecção de linhagens VapA e VapB (TAKAI et al., 1991; TAKAI et al., 1995a,b).

#### 4.5.2.2 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi obtido pelo método de lise alcalina. O material genético extraído foi analisado pela digestão com enzimas de restrição: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* e *EcoT22I* visando a determinação do tamanho plasmidial, nos quais as linhagens com 85 a 90kb foram caracterizadas como virulentas (VapA), enquanto os isolados entre 79 a 100kb foram identificados como de virulência intermediária (VapB). Os isolados desprovidos de plasmídios contendo os tamanhos supracitados foram considerados avirulentos (BIRNBOIM e DOLY, 1979; TAKAI et al., 1993).

#### 4.5.2.3 Reação em cadeia pela polimerase

A amplificação do material genético foi realizada em 10µl de DNA preparado em 50µl de volume contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3, a 25°C), 50 mM de KCl, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq* DNA-polimerase e 1mM de cada primer. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, segundo as seguintes condições de ciclos: desnaturação por 90 s a 94°C; anelamento por 1 min. a 55°C, e extensão por 2 min. a 72°C. A detecção de seqüências de genes de antígenos virulentos (15–17 kDa) foi realizada utilizando o *primer* 1 (5'–GACTCTTCACAAGACGGT–3') e *primer* 2 (5'–TAGGCGTTGTGCCAGCTA–3'), visando a amplificação de seqüência entre 552 e 569 pares de base. Para estirpes de virulência intermediária (20 kDa) foram utilizados o *primer* 3 (5'–AACGTAGTCGCGGTGAGAA–3') e *primer* 4 (5'–ACCGAGACTTGAGCGACTA–3'), para amplificação gênica entre 240 e 258 pares de base (TAKAI et al., 1995a,b). Cepas controle positivas para VapA, VapB e avirulentas foram cedidas pelo Prof. Shinji Takai da Universidade de Kitasato, Japão.

## **4.6 Diagnóstico de *E. coli***

### **4.6.1 Caracterização microbiológica**

Uma alíquota de 25g do material foi suspensa em 225 mL de água destilada esterilizada e cultivada em meio ágar sangue ovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, em condições de aerobiose, a 37°C, mantidas por 48 horas. Colônias sugestivas de *E. coli* foram identificadas segundo características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (KRIEG e HOLT, 1994) no laboratório de Doenças Infecciosas da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP.

### **4.6.2 Cultivo Microbiológico em Ágar MacConkey Sorbitol**

Simultaneamente, após a suspensão das amostras em água destilada esterilizada, o material foi semeado em ágar MacConkey sorbitol para pesquisa de estirpes não-fermentadoras de sorbitol (VERNOZY-ROZAND, 1997 e LANDGRAF et al., 1998). O meio de ágar MacConkey sorbitol foi mantido em temperatura de 37°C, em aerobiose, por 24 horas. As linhagens com colônias incolores foram consideradas sorbitol-negativas e submetidas aos testes de aglutinação para identificação do sorotipo O157:H7. Foi utilizado como controle de microrganismo sorbitol-negativo, cepa padrão de *E. coli* O157:H7 (EDL 933), cedida pela Profa. Ass. Dra. Mariza Langraf do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

### **4.6.3 Caracterização do Sorotipo O157:H7**

Todas as linhagens não-fermentadoras de sorbitol (semeadas no ágar MacConkey sorbitol), foram submetidas a testes de aglutinação, utilizando anti-soros comerciais para O157 e H7, de acordo com as recomendações do fabricante<sup>1</sup>. Como controle positivo foi utilizada cepa padrão de *E. coli* O157:H7 (EDL 933), cedida pelo Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental,

---

<sup>1</sup> Probac do Brasil. Produtos Bacteriológicos Ltda. São Paulo, SP.

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

#### 4.6.4 Reação em Cadeia pela Polimerase

A PCR foi realizada visando o diagnóstico dos seguintes fatores de virulência: Adesinas: intimina *eae*, fímbria P, fímbria S, adesina afimbrial. Toxinas: hemolisina, fator necrosante citotóxico, verotoxinas, toxinas termo-estável e toxina termo-lábil. Sistema de captação de ferro: aerobactina.

Foram utilizados os seguintes controles positivos para a classificação das adesinas e demais fatores de virulência: O157:H7 (*vt1*, *vt2*, *eae*), 2348/69 (*eae*, *bfp*, *eaf*), J96 (*papGII*, *papGIII*), FV223 (*papGII*), IANO (*stb*, *lt1*), FVL2 (*pap*, *sfa*, *iuc*, *cnf-1*, *saa*), FV232 (*afa*), EAEC O42 (*eaec*), B90 (*cnf-2*), FVL16 (*cnf-1*, *hly*, *pap*, *sfa*, *iuc*), ETEC13 (*sta*), EIEC (*ipaH*). Todas as cepas controles foram cedidas pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, do Laboratório de Antígenos Bacterianos II do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB – UNICAMP, Campinas, SP.

O método para obtenção de DNA consistiu na inoculação das linhagens em caldo cérebro coração (BHI), a 37°C, “overnight”. Após este período, as estirpes foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), a 37°C, por 24 horas. Em seguida, duas ou três colônias típicas foram suspensas 100µl de água ultra-pura esterilizada. Estas suspensões foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 9676,8g (12.000 rpm) por 3 minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para as reações de PCR (BLANCO et al. 1997).

Foram utilizados “primers” específicos para cada um dos genes, a saber: *vt1*, *vt2* (verotoxinas dos tipos 1 e 2), *papC* (proteína de membrana externa da fímbria P), *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina *papG*), *sfaS* (região conservada *sfa/foc* de fímbria S), *afaB/C* (região conservada chaperona âncora de adesina afimbrial), *hlyA* (proteína estrutural hemolítica), *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina), *eae* (gene codificador para *eae* – *E. coli* attachment and effacing), *cnf-1*, *cnf-2* (citotoxinas CNF-1 e 2), *sta*, *stb* (enterotoxinas STa e b), *saa* (adesina auto-aglutinante), *ipaH* (*E. coli* enteroinvasora), *eaec* (*E. coli* enteroagregativa), *bfp* (bundle-forming pilus), *eaf* (plasmídio EAF), *lt1* (enterotoxina LT1).

O quadro 1 apresenta a seqüência de iniciadores, peso molecular e temperatura de anelamento das reações de cada fator de virulência investigado

de *E. coli*, enquanto o Quadro 2 sumaria os reagentes e respectivas quantidades utilizadas nas reações.

QUADRO 1. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças de recreação públicos e privados, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, SP, 2008-2009.

Gene	Seqüência de oligonucleotídeos (5'- 3')	TA* (°C)	Produto amplificado (pb)	Quantidade iniciadores/ reação (ng/µg)	Referências
<i>Vt1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG CTGCTAATAGTTCTGCGCATC	53	894	90	BLANCO et al., 1997
<i>Vt2</i>	CTTCGGTATCCTATTCCCGG GGATGCATCTCTGGTCAT TG	53	478	90	BLANCO et al., 1997
<i>Eae</i>	ACGTTGCAGCATGGGTAATC GATCGGCAACAGTTTCACCTG	63	815	30	GANNON et al., 1993
<i>Bfp</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	58	326	30	GUNZBURG et al., 1995
<i>Eaf</i>	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	50	397	150	GUNZBURG et al., 1995
<i>Cnf-1</i>	GAAC TTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTA	63	543	90	BLANCO et al., 1996
<i>Cnf-2</i>	AATCTAATTAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	46	543	90	BLANCO et al., 1996
<i>Lt1</i>	GGCGACAGATTATAGCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	55	696	60	BLANCO et al., 1997
<i>Sta</i>	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTAC	50	147	30	BLANCO et al., 1997
<i>Stb</i>	ATCGCATTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	49	172	60	BLANCO et al., 1997
<i>PapC</i>	GACGGCTGACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	63	328	60	DAIGLE et al., 1994
<i>PapGI</i>	CAACCTGCTCTCAATCTTACTG CATGGCTGGTTGTTCCCTAAACAT	63	692	60	KARKKAINEN, et al., 1998
<i>PapGII</i>	CAACCTGCTCTCAATCTTACTG CATGGCTGGTTGTTCCCTAAACAT	63	562	60	KARKKAINEN, et al., 1998
<i>PapGIII</i>	CATGGCTGGTTGTTCCCTAAACAT TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	63	421	60	KARKKAINEN, et al., 1998
<i>afaB/C</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGGCCG	67	750	60	YAMAMOTO et al., 1995
<i>SfaS</i>	CGGAGGAATTACAAACCTGGCA CTCCGGAGAAGCTGGGTGCATCTTAC	63	410	90	DAIGLE et al., 1994
<i>lucD</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	63	602	60	YAMAMOTO et al., 1995
<i>Eaec</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	58	630	60	SCHMIDT et al., 1995
<i>Saa</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	60	119	50	PATON e PATON, 2002
<i>HlyA</i>	AACAAGGATAAGCAGTGTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	63	1117	60	YAMAMOTO et al., 1995
<i>lpaH</i>	GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	63	600	30	ARANDA et al., 2004

\*TA: temperatura de anelamento

QUADRO 2. Reagentes para as reações de PCR na detecção de fatores de virulência de *E. coli* isoladas de areia de praças e parques públicos e privados. Botucatu, SP, 2008-2009.

REAGENTES	VOLUME ( $\mu$ l)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultra-pura estéril (qsp)	30	----
10X "PCR Buffer" (Fermentas)	3	1X
25mM "dNTP mixture" (Fermentas)	0,24	0,2mM cada
"primer" 1	1	----
"primer" 2	1	----
50 Mm MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	2,4	2,0mM
DNA extraído	7	----
"Taq-DNA Polimerase" (1,5) (Fermentas)	0,3	1,5U
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>----</b>

\*Os iniciadores foram preparados em uma concentração de 30ng/ $\mu$ l. De acordo com a necessidade de iniciadores para as reações de PCR utilizou-se 1, 2 ou 3 vezes da concentração inicial.

As reações de PCR das soluções foram realizadas em termocicladores programados para pré-aquecimento a 94°C/10 minutos e 30 ciclos de 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com o gene pesquisado, temperatura de extensão de 72°C/2 minutos, seguida por 72°C/7 minutos. Após realizadas as amplificações dos DNAs bacterianos, foi adicionado às soluções 5  $\mu$ l de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 25% de ficoll). O gel de agarose foi preparado em concentração 2% em TAE (tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M e pH 8,0). Em cada poço do gel foram dispostos 10 $\mu$ l da mistura.

Em seguida foi procedida a eletroforese com 100mV por 40 minutos e amperagem variável. As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5  $\mu$ g/mL), por 15 minutos, e visualizadas em transluminador de luz UV. Os géis foram fotografados e as imagens capturadas pelo sistema Image Master® VDS e programa LISCAP-Capture Application, respectivamente.

#### 4.6.5 Filogenia

A classificação filogenética das linhagens foi realizada segundo Clermont *et al.* (2000) em PCR-Multiplex. Foi utilizado um par de *primers* para cada gene (*chuA* e *yjaA*) ou fragmento de DNA anônimo (TspE4.C2) (Quadro 3). O esquema proposto permitiu a classificação das cepas nos grupos filogenéticos A e B1 (comensais), B2 e D (extraintestinais).

Como padrões positivos para o gene *chuA* foram utilizadas as cepas J96 e/ou O157:H7; para *yjaA* foram utilizadas as cepas DH5 $\alpha$ , K-12 e/ou C600 e para TsPE4.C2 somente a cepa 2348/69.

QUADRO 3. Iniciadores utilizados para classificação filogenética\* de linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças de recreação públicos e privados, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, SP, 2008-2009.

Gene	Seqüência de oligonucleotídeos (5'- 3')	TA** (°C)	Produto amplificado (pb)	Quantidade iniciadores/ reação (ng/ $\mu$ g)
<i>ChuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTAGGAAAGACA	55	279	30
<i>YjaA</i>	TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	55	211	30
<i>TspE4.C2</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	55	152	30

\*Classificação proposta por CLERMONT *et al.*, 2000.

\*\*TA: temperatura de anelamento

#### 4.6.6 Contagem de coliformes totais a 35°C e *E. coli*

Foram pesados assepticamente 25 g de cada amostra e transferidos para sacos plásticos esterilizados. Em seguida, foram adicionados 225 mL de solução salina esterilizada e homogeneizado em "stomacher" por 2 minutos. Alíquotas de 1mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram transferidas para placas de Petrifilm<sup>TM</sup> (3M)<sup>2</sup>, que permite a diferenciação das colônias de coliformes totais das de *E. coli*. A incubação foi realizada a 35°C por 24-48h, conforme recomendação do fabricante.

<sup>2</sup> Petrifilm, 3M do Brasil Ltda, Microbiologia. Sumaré, SP.

## **4.7 Diagnóstico de *Salmonella* sp**

### **4.7.1 Caracterização microbiológica**

Foram pesados assepticamente 25 g de cada amostra e transferidos para sacos plásticos esterilizados. Em seguida, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada esterilizada a 1,0% e homogeneizado em “stomacher” por 2 minutos. Os sacos plásticos contendo as amostras e o diluente foram incubados a 35°C por 18-24h. Subseqüentemente, 0,1 mL e 1 mL do líquido da mistura pré-enriquecida foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrionato (TT), respectivamente, e a incubação de ambos foi realizada a 42°C (RV) e 35°C (TT), por 18 – 24h. Em seguida, os caldos de enriquecimento seletivo foram estriados com alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo ágar Bismuto de Sulfito (BS) e ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), com incubação a 35°C por 18-24h. Colônias características de *Salmonella* sp foram repicadas para o ágar TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar), incubados a 35°C, por 18–24h. Colônias sugestivas de *Salmonella* sp em pelo menos um dos meios (TSI ou LIA) foram submetidas a testes bioquímicos adicionais: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação do movimento e produção de fenilalanina desaminase (ANDREWS et al, 1998).

### **4.7.2 Teste de aglutinação com soro polivalente e caracterização de sorotipos**

As linhagens de *Salmonella* isoladas foram submetidas ao teste de aglutinação gênero-específica em lâmina, utilizando soro polivalente comercial anti-*Salmonella* flagelar e somático, de acordo com as recomendações do fabricante<sup>3</sup>. Os resultados foram expressos em ausência ou presença de *Salmonella* sp. As linhagens caracterizadas como *Salmonella* nos testes bioquímicos e com aglutinação positiva em lâmina foram encaminhadas para caracterização de sorotipos (POPOFF e LE MINOR, 1992), no Setor de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

---

<sup>3</sup> Soro polivalente anti-*Salmonella*. Probac do Brasil. Produtos Bacteriológicos do Brasil Ltda. São Paulo, SP.

## **4.8 Diagnóstico de *Toxocara* sp.**

### **4.8.1 Recuperação de ovos**

Foi separado um grama de cada amostra de areia e adicionado 6,0 mL de água destilada, mantido em repouso por no mínimo duas horas. Após este período, o material foi transferido para tubo cônico de centrifuga graduado para 12,0 ml, homogeneizado durante dois minutos e depois centrifugado durante cinco minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 6,0 ml da mesma solução, que em seguida foi novamente homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e recebeu adição de 10,0 ml de solução de nitrato de sódio ( $d=1.20$ ), que consistiu na etapa de flutuação dos ovos. Após re-suspensão do material, foi realizada nova centrifugação com o mesmo padrão supracitado. Após esse processo, o tubo foi preenchido com a mesma solução de flutuação até a formação de menisco. Em seguida, foi disposta uma lamínula de vidro de 22x22mm sobre o menisco, e o tubo ficou na posição vertical por cinco minutos, visando a flutuação de ovos. A lamínula foi transferida para uma lâmina histológica, para a pesquisa de ovos do parasita, em objetiva de 10X.

O processo de flutuação descrito acima foi repetido mais duas vezes, totalizando a leitura em triplicata de cada alíquota de material (SANTARÉM et al, 1998).

## **4.9 Diagnóstico de *T. gondii***

### **4.9.1 Recuperação de oocistos**

Dos 250 gramas de amostra de cada local foram separados 5g de solo e/ou areia e diluído em 50 mL de água. Em seguida, a diluição foi submetida ao agitador magnético por 10 minutos, filtrada em filtro de malha fina e centrifugada em 2500 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em 10-15 mL de água. Após a resuspensão do sedimento, o material foi misturado com 50 mL de solução de sacarose e centrifugado a 1000 rpm por três minutos. O tubo contendo a mistura do sedimento resuspendido com a solução de sacarose foi mantido em posição vertical durante três horas. Em seguida, foi colhido 5 mL do sobrenadante e adicionado 80 mL de água, centrifugado a 2500 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e uma pequena quantidade de água foi misturada de forma homogênea ao sedimento. Logo após, uma gota foi observada em

microscópio óptico. Na presença de oocistos do gênero *Toxoplasma*, o material foi submetido a identificação da espécie mediante o isolamento em camundongos (FREYRE, 1989).

#### **4.9.2 Inoculação em camundongos**

O isolamento de *Toxoplasma gondii* em camundongos consiste na inoculação de quatro camundongos por amostra suspeita, pela via intraperitoneal. Os animais inoculados são mantidos em observação por período máximo de 60 dias, em sala com controle de temperatura e luz, recebendo água e alimento *ad libitum*. Dos animais que morrerem durante o período de observação são examinados o líquido peritoneal na busca de taquizoítos de *T. gondii*, além da realização de decalques de fragmentos de baço, fígado, pulmão e cérebro, corados pelo método de Giemsa. Dos animais que sobreviverem ao período de observação, é colhido o sangue pela punção do seio retro-orbital, e após separação do soro, realizado o método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma*. Foram consideradas positivas aquelas amostras em que forem observadas formas parasitárias no líquido peritoneal ou nos órgãos, ou naqueles animais em que o MAD foi positivo (DUBEY e BEATTIE, 1988).

### **4.10 Diagnóstico de Coronavírus Bovino (BcoV)**

#### **4.10.1 Reação de Transcriptase Reversa**

As amostras de areia foram pesquisadas quanto à presença de coronavírus bovino utilizando-se reação de transcrição reversa, seguida por reação em cadeia pela polimerase em nested (nested-RT-PCR) dirigida à amplificação de segmento de 136 pares de bases da ORF1b, codificadora da RNA-polimerase RNA-dependente viral, segundo BRANDÃO et al. (2005).

#### **4.10.2 Extração de RNA**

O RNA total foi extraído do sobrenadante das suspensões de areia utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen™) de acordo com as instruções do

fabricante, utilizando-se a amostra Kakegawa de BCoV como controle positivo e água-DEPC como negativo.

#### **4.10.3 Síntese de cDNA (Transcrição-Reversa)**

Foram desnaturados 3,5 µL do RNA extraído a 95°C durante 5 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (4Bm e 2Bp, Quadro 4) e 100U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para reação final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

#### **4.10.4 Primeira Amplificação**

Foi utilizado volume de 2,5µL de cada respectivo cDNA e adicionado ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (4Bm e 2Bp), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura esterilizada para uma reação final de 25µL, submetendo-se a 6 ciclos de 94°C/1 minuto, 40°C /2 minutos e 72°C/1 minuto, 36 ciclos de 94°C/1 minuto, 50°C /1,5 minuto e 72°C/1 minuto, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

#### **4.10.5 Segunda Amplificação (Nested)**

Foram adicionados 2,5 µL do produto da primeira amplificação ao mix de nested-PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer CV2L e CV2U (Quadro 4), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura esterilizada para uma reação final de 25µL, submetendo-se a 26 ciclos de 94°C/1 minuto, 54,8°C /1,5 minuto e 72°C/1 minuto seguidos de 72°C/10 minutos para extensão final.

A cada três amostras adicionadas na reação de nested foi adicionado um tubo contendo água ultra-pura esterilizada para o monitoramento de contaminações, também adicionada de mix de nested PCR e levado ao termociclador.

Após a reação de nested, dez microlitros foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5

µg/mL e observado sob luz ultra-violeta, e consideradas positivas as amostras que resultassem banda de 136 pb.

QUADRO 4. Primers dirigidos ao gene da RdRp utilizados na nested-RT-PCR para a detecção de coronavírus bovino, em amostras de areia de parques e praças de recreação públicos e privados. Botucatu, SP, 2008-2009.

Primer	Seqüência (5'-3')	Amplicon	Referência
4Bm	TCACAYTTWGGATARTCCCA	251 pb	Stephensen <i>et al.</i> , 1999
2Bp	ACTCARWTRAATYTNAATAYGC	251 pb	Stephensen <i>et al.</i> , 1999
CV2U	TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA	136 pb	Brandão <i>et al.</i> , 2005
CV2L	AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA	136 pb	Brandão <i>et al.</i> , 2005

#### 4.10.6 Vírus de Referência

Como vírus de referência de coronavírus bovino foi utilizada a cepa Kakegawa (AKASHI *et al.*, 1980), mantida em cultura de células da linhagem HmLu (pulmão de hamster), com título hemaglutinante de 256.

#### 4.11 Diagnóstico de Rotavírus

Para a detecção de rotavírus foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) descrita por HERRING *et al.* (1982), conforme descrito a seguir:

##### 4.11.1 Extração de RNA

Para a realização da técnica de PAGE, o RNA total foi extraído das suspensões de areia, do controle positivo (amostras NCDV) e do controle negativo (água-DEPC) seguindo-se o protocolo a seguir:

Foi homogeneizado em vórtex, durante 1 minuto, 400µL da suspensão de areia ou dos controles positivo ou negativo com 40µL de SDS a 10%, 40µL de acetato de sódio 1M e 400µL de álcool isoamílico/ clorofórmio/fenol pH 4,0 (1/24/37,5 v/v/v). Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 g durante dois minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo 800µL de etanol absoluto. Este material foi incubado a -20°C durante 18 horas. O material resultante foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C, desprezado sobrenadante e o excesso de etanol secado em papel de filtro. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 20µL de dissociador da amostra (SDS 0,3%, 2-Mercaptoetanol 0,5%, Glicerol 4% e Azul de bromofenol 0,0005%), e o material incubado durante 15 minutos a 56 °C.

#### **4.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo a 3,5%/7,5% sob corrente elétrica de 20 miliamperes durante 2,5 horas, utilizando placas de 10 x 15 cm. Em seguida, o gel foi fixado em etanol 10%/ ácido acético 0,5%, durante 30 minutos, e corado com nitrato de prata 0,01M durante 30 minutos. Finalmente, a coloração foi revelada com hidróxido de sódio 0,075M e formaldeído 0,3%, durante 15 minutos, observando-se o gel sob transiluminador de luz branca.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentarem 11 bandas de RNA em qualquer um dos sete eletroferótipos correspondentes aos sete grupos/espécies de rotavírus (A, B, C, D, E, F e G) [ESTES e KAPIKIAN, 2007].

#### **4.11.3 Vírus de referência**

Como vírus de referência de rotavírus foi utilizada a cepa NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Vírus, WHITE et al., 1970) mantida em células da linhagem MA-104 (rim fetal de macaco Rhesus).

#### **4.12 Análise estatística**

Foram calculadas as freqüências absolutas e relativas de detecção de cada um dos enteropatógenos, segundo os meses e locais de colheita, utilizando o teste G de Williams e o Exato de Fischer. Foram calculadas também as medianas e os percentis P25 e P75 das contagens de coliformes totais e *E. coli*, segundo o mês e o local de colheita, utilizando o teste de Friedman e o teste de Mann-Whitney. Para todos os cálculos foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$  (DEAN et al., 1994).

## 5 RESULTADOS

Os enteropatógenos identificados nas amostras de areia dos parques e praças segundo os meses de colheita estão sumariados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta a freqüência de enteropatógenos identificados na areia das praças públicas e privadas.

Não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) para a presença de enteropatógenos isolados/identificados nas amostras de areia dos parques e praças nos diferentes meses e locais de colheita ao longo do estudo.

TABELA 1. Freqüência de enteropatógenos identificados na areia de parques e praças recreacionais, segundo o mês de obtenção das amostras. Botucatu, SP, 2008-2009.

Mês	<i>Coronavirus</i>				<i>E. coli</i>				<i>R. equi</i>				<i>Toxocara sp</i>			
	Neg		Pos		Neg		Pos		Neg		Pos		Neg		Pos	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AGO 2008	50	100	0	0	37	74	13	26	45	90	5	10	47	94	3	6
NOV 2008	49	98	1	2	38	76	12	24	47	94	3	6	50	100	0	0
FEV 2009	50	100	0	0	34	68	16	32	44	88	6	12	50	100	0	0
MAI 2009	50	100	0	0	28	56	22	44	41	82	9	18	50	100	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>199</b>	<b>99.5</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>137</b>	<b>68.5</b>	<b>63</b>	<b>31.5</b>	<b>177</b>	<b>88.5</b>	<b>23</b>	<b>11.5</b>	<b>197</b>	<b>98.5</b>	<b>3</b>	<b>1.5</b>
<b>Teste G</b>	<b>1,52</b>				<b>5,44</b>				<b>3,57</b>				<b>6,62</b>			
<b>Valor de P</b>	<b>0,68</b>				<b>0,14</b>				<b>0,31</b>				<b>0,08</b>			

Valores de  $P$  menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre os meses, para um mesmo organismo, pelo teste  $G$  de Williams.

Neg = negativo Pos = positivo

Ago = agosto Nov = novembro Fev = fevereiro Mai = maio

Linhagens de *E. coli* e *R. equi* foram isoladas em todas as colheitas de material ao longo do estudo. Foram isoladas 23 (11,5%) linhagens de *R. equi* das 200 amostras de areia de 10 parques/praças, das quais 13 (13,0%) em praças públicas e 10 (10,0%) em parques privados (Tabela 2). No mês de agosto foram isoladas cinco (10,0%) estirpes de *R. equi*, três (6,0%) em novembro, seis (12,0%) em fevereiro e nove (18,0%) em maio (Tabela 1).

Foram isoladas 63 (31,5%) linhagens de *E. coli* nas 200 amostras de areia, das quais 34 (34,0%) em praças públicas e 29 (29,0%) em parques privados (Tabela 2). No mês de agosto foram isoladas 13 (26,0%) linhagens de *E. coli*, 12 (24,0%) no mês de novembro, 16 (32,0%) no mês de fevereiro e 22 (44,0%) no mês de maio (Tabela 1).

Ovos de *Toxocara* sp. foram recuperados somente na primeira colheita em três (1,5%) locais, dois públicos e um privado (Tabelas 1 e 2).

Material genético de *Coronavírus* bovino foi identificado somente na segunda colheita, no mês de novembro (Tabela 1), em uma (2,0%) praça pública (Tabela 2).

*Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii* e *Rotavírus* não foram identificados em nenhuma praça ou parque nos meses de estudo.

Houve tendência de maior isolamento dos microrganismos bacterianos (*E. coli* e *R. equi*) nas amostras de areia colhidas das praças e parques (públicos e privados) nos meses de verão (fevereiro) e outono (maio) [Figura 1].

A Figura 2 mostra as freqüências de detecção dos diferentes enteropatógenos identificados nas amostras de areia, segundo os locais de colheita.

TABELA 2. Frequência de enteropatógenos identificados na areia de parques e praças recreacionais, segundo o local de obtenção das amostras. Botucatu, SP, 2008-2009.

Natureza do parque	<i>Coronavirus</i>				<i>E. coli</i>				<i>R. equi</i>				<i>Toxocara sp</i>			
	Neg		Pos		Neg		Pos		Neg		Pos		Neg		Pos	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Privado</b>	100	100,0	0	0,0	71	71,0	29	29,0	90	90,0	10	10,0	99	99,0	1	1,0
<b>Público</b>	99	99,0	1	1,0	66	66,0	34	34,0	87	87,0	13	13,0	98	98,0	2	2,0
<b>TOTAL</b>	<b>199</b>	<b>99,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>137</b>	<b>68,5</b>	<b>63</b>	<b>31,5</b>	<b>177</b>	<b>88,5</b>	<b>23</b>	<b>11,5</b>	<b>197</b>	<b>98,5</b>	<b>3</b>	<b>1,5</b>
<b>Valor de P</b>	<b>0,50</b>				<b>0,27</b>				<b>0,33</b>				<b>0,50</b>			

Valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre os parques, para um mesmo organismo, pelo teste Exato de Fischer.

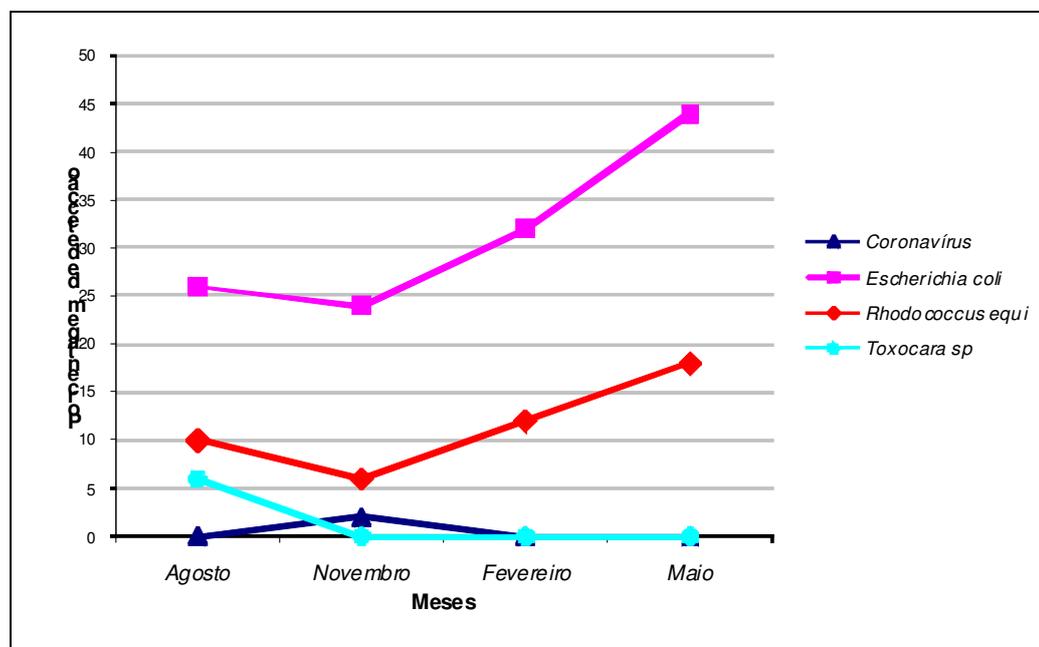


FIGURA 1. Frequências relativas de detecção de diferentes enteropatógenos em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de coleta. Botucatu, SP, 2008-2009.

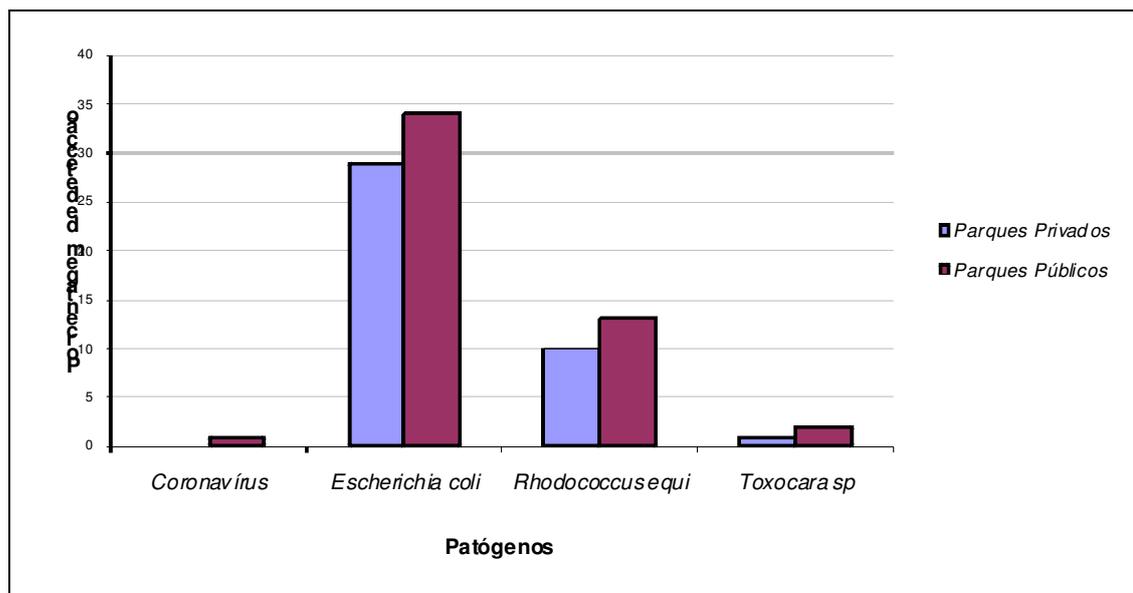


FIGURA 2. Frequências relativas de detecção de diferentes enteropatógenos em amostras de areia de parques e praças públicas ou privadas. Botucatu, SP, 2008-2009.

As Tabelas 3 e 4 apresentam a mediana, os valores máximos, mínimos e os percentis (P25 e P75) das contagens de coliformes totais e *E. coli*, ao longo do estudo. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) nos valores de mediana dos coliformes totais entre os meses de colheita. Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) dos valores de mediana de *E. coli*, com maiores contagens observadas nos meses de fevereiro e maio em comparação ao mês de agosto.

TABELA 3. Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de coliformes totais (UFC/g) em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

Mês de colheita	Mediana	Máximo	Mínimo	P25	P75
Agosto 2008	$3,50 \times 10^{1a}$	$3,00 \times 10^3$	$< 10^1$	$9,00 \times 10^1$	$1,25 \times 10^2$
Novembro 2008	$8,50 \times 10^{1a}$	$9,00 \times 10^3$	$< 10^1$	$1,25 \times 10^1$	$2,00 \times 10^2$
Fevereiro 2009	$9,50 \times 10^{1a}$	$5,50 \times 10^3$	$< 10^1$	$1,25 \times 10^1$	$2,15 \times 10^2$
Maio 2009	$1,05 \times 10^{2a}$	$6,00 \times 10^3$	$< 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$2,53 \times 10^2$

Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meses de colheita, pelo teste de Friedman.

TABELA 4. Mediana, valores máximos, mínimos, e percentis (P25 e P75) da contagem de *Escherichia coli* (UFC/g) em amostras de areia de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

<b>Mês de colheita</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>
Agosto 2008	<10 <sup>1a</sup>	4,00x10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
Novembro 2008	<10 <sup>1ab</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	1,00x10 <sup>1</sup>
Fevereiro 2009	1,00x10 <sup>1b</sup>	4,70x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	6,50x10 <sup>1</sup>
Maio 2009	<10 <sup>1b</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	3,00x10 <sup>1</sup>

Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meses de colheita, pelo teste de Friedman.

As Figuras 3 e 4 representam os valores de mediana e dos percentis P25 e P75 das contagens de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de areia, segundo os meses de colheita, respectivamente.

Houve maiores contagens de *E. coli* nas amostras obtidas nos meses de fevereiro e maio, com pico máximo em fevereiro, comparativamente aos outros meses.

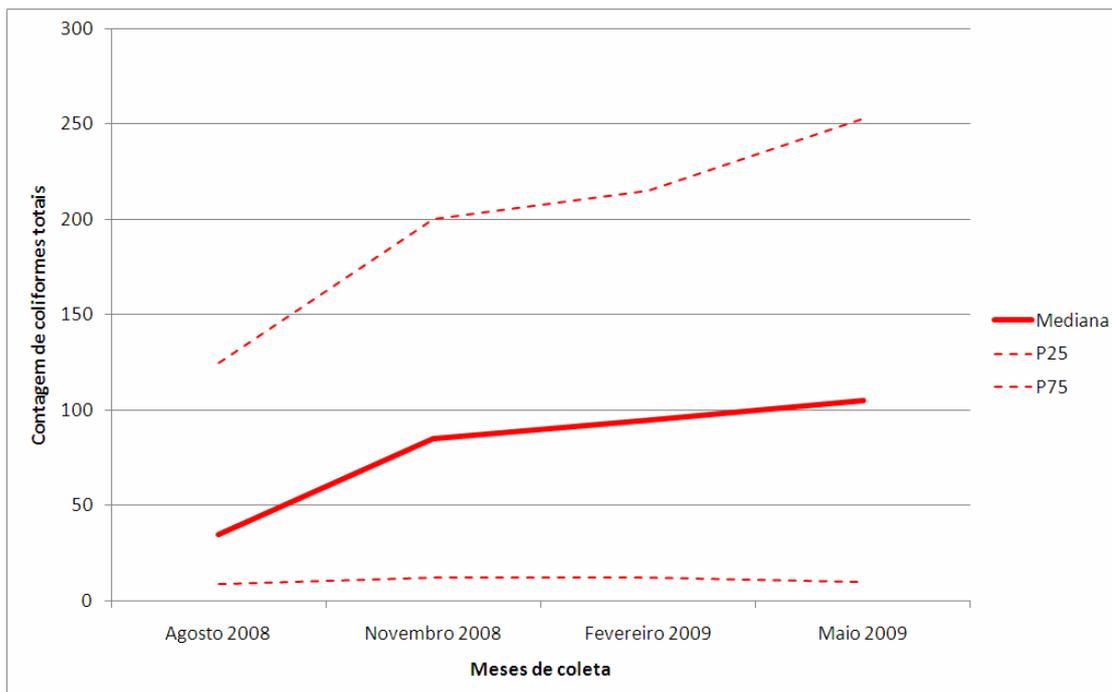


FIGURA 3. Mediana e percentis das contagens de coliformes totais (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

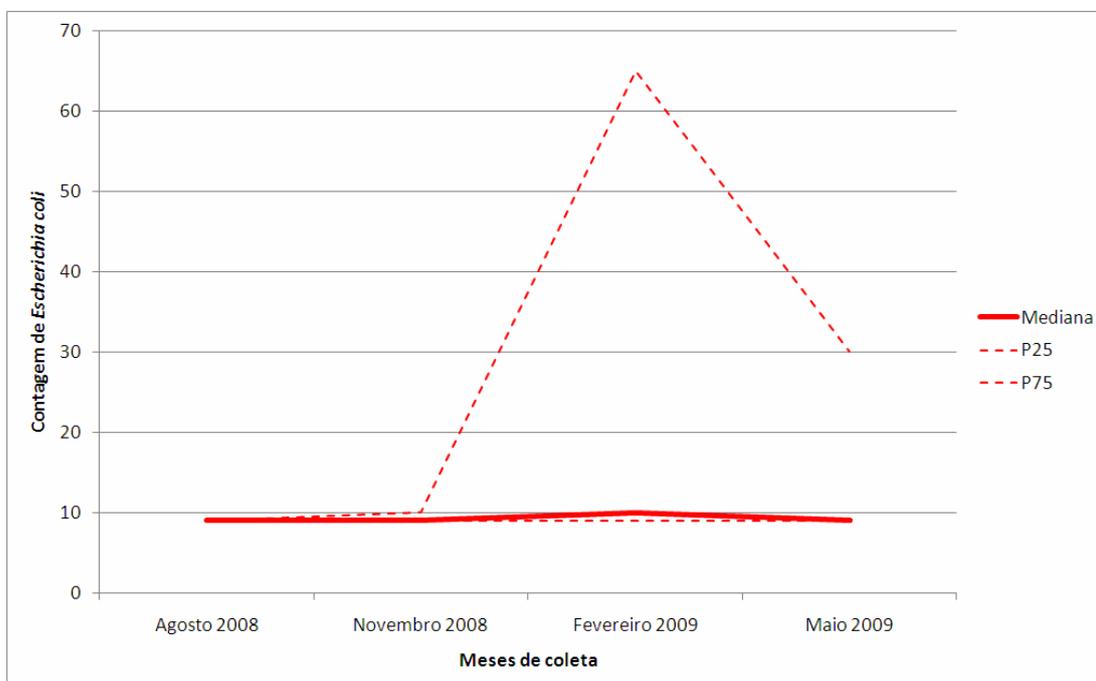


FIGURA 4. Mediana e percentis das contagens de *Escherichia coli* (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo os meses de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

As Tabelas 5 e 6 sumarizam a mediana, os valores máximos, mínimos e os percentis (P25 e P75) das contagens de coliformes totais e *E. coli*, segundo os locais de colheita das amostras, respectivamente. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) dos valores de mediana de coliformes totais e *E. coli* entre as colheitas realizadas nos locais públicos ou privados.

TABELA 5. Mediana, valores máximos, mínimos e percentis (P25 e P75) da contagem de coliformes totais (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

<b>Local de colheita</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>
Parques privados	$6,00 \times 10^{1a}$	$9,00 \times 10^3$	$< 10^1$	$< 10^1$	$2,28 \times 10^2$
Parques públicos	$7,00 \times 10^{1a}$	$3,50 \times 10^3$	$< 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^2$

Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de colheita, pelo teste de Mann-Whitney.

TABELA 6. Mediana, valores máximos, mínimos e percentis (P25 e P75) da contagem de *Escherichia coli* (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

<b>Local de colheita</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>
Parques privados	$< 10^{1a}$	$4,70 \times 10^3$	$< 10^1$	$< 10^1$	$2,25 \times 10^1$
Parques públicos	$< 10^{1a}$	$2,20 \times 10^3$	$< 10^1$	$< 10^1$	$1,25 \times 10^1$

Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de colheita, pelo teste de Mann-Whitney.

As Figuras 5 e 6 representam os valores de mediana e dos percentis P25 e P75 das contagens de coliformes totais e *E. coli* das amostras de solo e areia obtidas ao longo do estudo, segundo os locais de colheita, respectivamente.

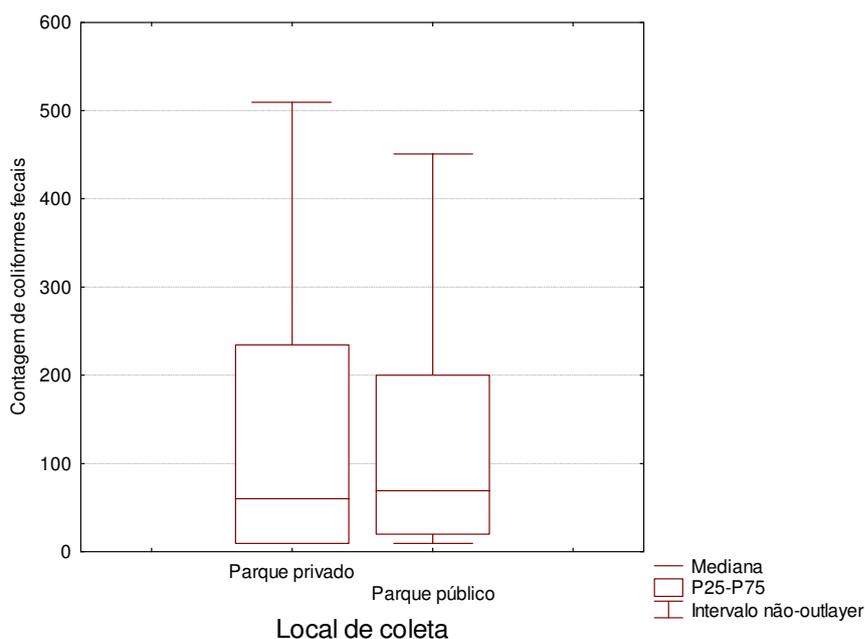


FIGURA 5. Mediana, percentis e valores extremos (não *outlayers*) das contagens de coliformes totais (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

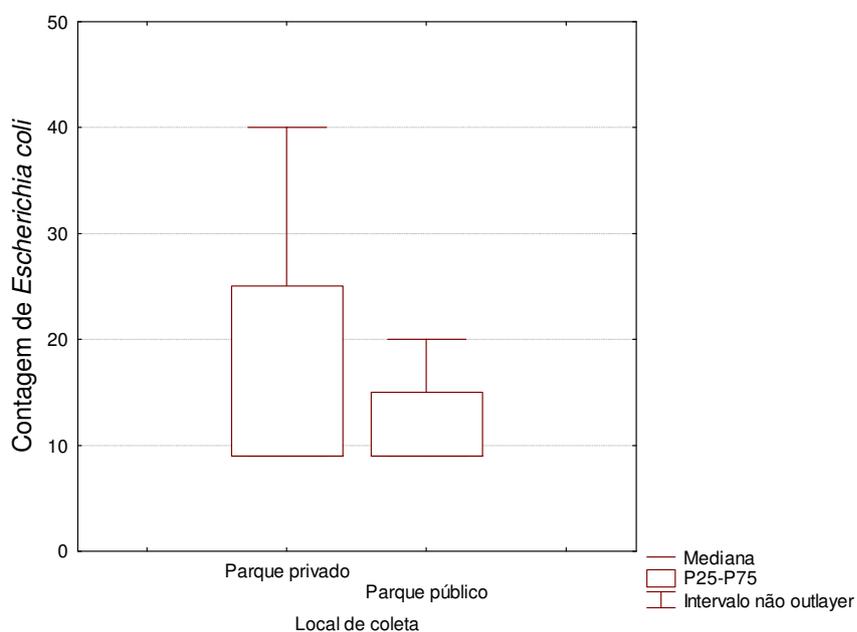


FIGURA 6. Mediana, percentis e valores extremos (não *outlayers*) das contagens de *Escherichia coli* (UFC/g) em amostras de areia obtidas de parques e praças recreacionais, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2008-2009.

A caracterização do perfil de virulência plasmidial (Vap A, Vap B ou avirulentas) das 23 linhagens de *R. equi* revelou que todos os isolados foram identificados como avirulentos.

Na classificação em grupos filogenéticos das linhagens de *E. coli* foram obtidas 16 estirpes do grupo comensal A, 32 do grupo comensal B1 e 15 do grupo extraintestinal B2.

Dentre os marcadores de virulência das linhagens de *E. coli* isoladas das amostras de areia das praças públicas, em quatro linhagens foi detectado o gene *saa* (primeira colheita), uma para o gene *eae* (segunda colheita), três para o gene *saa* (terceira colheita) e uma para o gene *iucD* (quarta colheita). Nas linhagens isoladas dos parques privados, em três linhagens foi identificado o gene *saa* (primeira colheita), uma para o gene *saa*, uma para os genes *eae* e *bfp* e uma para os genes *saa*, *eae* e *bfp* (terceira colheita) e em uma os genes *papGI*, *sfa* e *hly* (Tabelas 7 e 8). Os demais marcadores de virulência não foram identificados em nenhuma das linhagens de *E. coli*.

TABELA 7. Marcadores de virulência identificados em linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças recreacionais nos meses de agosto e novembro. Botucatu, SP, 2008.

Praça Pública	Nº linhagens	Agosto		Nº linhagens	Novembro	
		Gene	Filogenia		Gene	Filogenia
1	1	<i>Saa</i>	A	-	-	-
3	2	<i>Saa</i>	A	1	<i>eae</i>	B1
5	1	<i>Saa</i>	B1	-	-	-
<b>Parque privado</b>						
4	3	<i>Saa</i>	A	-	-	-

Nº = número

TABELA 8. Marcadores de virulência identificados em linhagens de *E. coli* isoladas de areia de parques e praças recreacionais nos meses de fevereiro e maio. Botucatu, SP, 2009.

Praça Pública	Nº linhagens	Fevereiro		Nº linhagens	Maio	
		Gene	Filogenia		Gene	Filogenia
3	2	<i>saa</i>	B1	1	<i>iucD</i>	B1
	1	<i>saa</i>	B2			
<b>Parque privado</b>						
2	-	-	-	1	<i>papGI,</i> <i>sfa, hly</i>	A
3	1	<i>saa</i>	B2	-	-	-
	1	<i>saa,</i> <i>eae,</i> <i>bfp</i>	B1	-	-	-
4	1	<i>eae,</i> <i>bfp</i>	B1	-	-	-

Nº = número

## 6 DISCUSSÃO

*R. equi* são bactérias de comportamento oportunista, relacionadas a graves infecções piogranulomatosas nos animais. Nos humanos, as infecções por *R. equi* são descritas em indivíduos com debilidade orgânica, ou imunossuprimidos, em especial, pacientes acometidos pela AIDS (LINDER, 1997; TAKAI et al., 2002). Conforme a Organização Panamericana da Saúde-OPS (2001), 88% da casuística atual da rodococose é atribuída a co-infecção pelo vírus da AIDS. No Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica assinalou que entre 1980 e 2006 ocorreram 433 mil casos de Aids oficialmente notificados (BRASIL, 2007).

A patogenicidade do organismo foi atribuída à presença de marcadores de virulência de origem plasmidial. As estirpes virulentas (VapA) têm sido identificadas em potros e em pacientes humanos com AIDS, enquanto as estirpes de virulência intermediária são identificadas principalmente na linfadenite em suínos e humanos com AIDS. As linhagens avirulentas são encontradas no ambiente de criatórios de animais domésticos, em solos/areia de parques de recreação de humanos e também em indivíduos HIV-positivos (TAKAI et al., 1996; TAKAI et al., 1997). No presente estudo foram isoladas 23 linhagens avirulentas de *R. equi* do solo e areia de parques e praças recreacionais, sem diferença estatística entre os ambientes de acesso público ou privado.

Em outros países também tem sido descrita a rodococose em humanos causada por linhagens avirulentas (TAKAI et al., 2002). Na Hungria, a investigação da virulência de 48 estirpes isoladas do solo de dois criatórios de eqüinos identificou 26 (54,2%) isolados virulentos ou VapA (85 kb tipo I) [MAKRAI et al., 2002]. Takai et al. (1996) isolaram *R. equi* em 73,9% amostras de areia e terra de 115 parques e 49 jardins no Japão, e todas as estirpes foram caracterizadas como avirulentas. Esses autores alertaram para a alta contaminação do ambiente de parques e jardins no Japão por *R. equi* e destacaram a importância de estudos voltados à avaliação do risco de contaminação destes ambientes na transmissão do microrganismo. No Brasil, Ribeiro (2008) estudou recentemente a infecção por *R. equi* em 20 humanos, e constatou que 11 indivíduos foram acometidos por linhagens avirulentas,

encontradas predominantemente no ambiente dos criatórios dos animais ou do cotidiano de humanos, como praças e parques.

No presente estudo, a identificação do microrganismo em praças públicas se deve, provavelmente, ao acesso de animais domésticos nestes locais, tornando o ambiente contaminado pela eliminação fecal do microrganismo, pela contaminação da sola do calçado de crianças, adultos ou funcionários, ou mesmo pela areia procedente de ambiente previamente contaminado. Em contraste, nas praças e parques privados que não possuem livre acesso de animais, a contaminação ambiental poderia ser creditada a veiculação da bactéria na sola dos calçados dos usuários ou pela areia previamente contaminada. A presença de estirpes avirulentas no ambiente de recreação humana ao longo de todas as estações do ano, durante o decorrer do estudo, requer preocupação no contexto de saúde pública, em virtude da ocorrência da rodococose em humanos por estirpes avirulentas, particularmente em HIV-positivos, indivíduos com imunossupressão ou com imaturidade do sistema imune, como crianças (VERVILLE et al, 1994; TAKAI et al., 1995b).

*E. coli* é reconhecida classicamente como a enterobactéria mais importante dos animais e humanos. Nos humanos, está bem documentada sua participação em distúrbios gastrintestinais graves, infecções genito-urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias (SUSMANN, 1997).

O livre acesso de animais em locais de recreação humana pode acarretar na contaminação dos ambientes pela veiculação do agente pelas fezes, favorecendo a ocorrência da doença, especialmente em crianças. No Brasil, os estudos de infecções por *E. coli* geralmente são conduzidos na avaliação de alimentos contaminados e de humores orgânicos de pacientes infectados (FRANCO & LANDGRAF, 1996; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). No entanto, nota-se pouca preocupação em investigar a contaminação do ambiente nos casos de colibacilose em humanos.

No presente estudo foram isoladas 63 linhagens de *E. coli* nos 10 parques e praças recreacionais, sem diferença estatística entre os de origem privada ou pública. À semelhança de *R. equi*, a identificação de *E. coli* nas praças públicas se deve, provavelmente, ao fácil acesso de animais nestes locais. Nos parques privados a contaminação ambiental poderia ser justificada

também pela veiculação da bactéria na sola de calçados dos usuários, à areia procedente de ambientes previamente contaminados e ao eventual acesso de aves em certos locais estudados. No entanto, não foram encontrados no Brasil estudos sobre a ocorrência de classes patogênicas de *E. coli* na areia/solo de parques recreacionais, tampouco que investigassem os fatores de virulência dos isolados. Vieira et al. (2001) avaliaram a presença de *E. coli* em areia seca e úmida de três praias de Fortaleza, CE, e encontraram entre 16-56% de contaminação em areia seca e 24-48% em areia úmida, embora não tenham investigado os marcadores de virulência das estirpes.

*E. coli* O157:H7 são relacionadas nos humanos às graves manifestações clínicas de colite hemorrágica e falha renal aguda, de curso freqüentemente fatal em crianças e pacientes debilitados (TAUXE, 1997). No Brasil, as investigações de *E. coli* O157:H7 verotoxigênicas foram iniciadas com a detecção do sorotipo nas fezes de bovinos de abatedouro (CERQUEIRA et al., 1999). Subseqüentemente, os estudos têm avançado na investigação do sorotipo em alimentos de origem animal (RIBEIRO et al., 2006) e, de forma preocupante, em humanos acometidos por distúrbios gastroentéricos e renais (DE SOUZA et al., 2007). Entretanto, não está claramente estabelecido, incluindo no Brasil, o impacto da manutenção deste sorotipo patogênico no ambiente dos humanos.

No presente estudo não foi identificado o sorotipo O157:H7 nas amostras de areia estudadas. Em contraste, Scott et al. (2009), na Irlanda, analisaram amostras de fezes e do solo de criatórios de bovinos e identificaram sete sorotipos de *E. coli* verotoxigênicas, ressaltando os reflexos em saúde pública da presença destes sorotipos na contaminação do ambiente. Até o momento não está esclarecido o real impacto de *E. coli* O157:H7 na epidemiologia de doenças em humanos e em animais no Brasil. Com efeito, estudos que investiguem a presença de linhagens verotoxigênicas em animais, alimentos, água, ambiente e em afecções em humanos são de extrema importância na vigilância epidemiológica, notadamente em virtude da letalidade do sorotipo O157:H7 em crianças.

As manifestações clínicas entéricas e extra-entericas das colibaciloses estão diretamente relacionadas à presença de diferentes fatores de virulência,

que conferem a patogenicidade e habilidade de adaptação da bactéria a vários sítios de infecção (KAPER et al., 2004).

Dentre os genes marcadores de virulência investigados nos isolados dos parques e praças foram encontradas três linhagens detentoras do gene *eae*, das quais duas também apresentavam o gene *bfp*. O gene *eae* codifica a intimina, proteína responsável pela junção íntima de EPEC às células epiteliais. Este gene está presente na ilha de patogenicidade chamada de “*locus enterocyte effacement*” (MCDANIEL et al., 1995). A adesão destas linhagens também está associada ao plasmídeo EAF que codifica pili denominado BFP (bundle-forming pilus), que estabiliza a bactéria em microcolônias (NATARO e KAPER, 1998). As linhagens EPEC típicas possuem o gene *eae* e o plasmídeo EAF. As estirpes atípicas detêm somente o gene *eae* (TRABULSI et al., 2002). Desta forma, as três linhagens identificadas no solo/areia dos parques e praças são consideradas EPEC atípicas. A classe EPEC predomina como causa de diarreia em crianças com menos de um ano, sobretudo em países emergentes (NATARO e KAPER, 1998). A presença de linhagens desta classe patogênica no ambiente recreacional é indicativo de contaminação ambiental, e deve ser considerado como preocupante no contexto de Saúde Pública, em virtude do acesso freqüente de crianças menores de um ano nos ambientes amostrados.

A adesina plasmidial autoaglutinante foi descoberta por Paton et al. (2001) e sua virulência ainda permanece não totalmente esclarecida. Curiosamente, 12 dentre os 63 isolados de *E. coli* dos ambientes recreacionais estudados foram detentores do gene *saa*, que codifica a adesina plasmidial autoaglutinante. Apesar da patogenicidade incerta, esta adesina foi isolada em linhagem de *E. coli* verotoxigênica responsável por surto de síndrome hemolítica urêmica (PATON et al., 2001), em isolados de STEC em humanos (PATON e PATON, 2002; JENKINS et al., 2003), em indivíduos assintomáticos e fezes de bovinos saudáveis (JENKINS et al., 2003). Estes achados indicam que este marcador de virulência deve ser objeto de estudos futuros, com intuito de esclarecer seu impacto na patogenicidade do microrganismo e seus reflexos em Saúde Pública.

Somente uma linhagem de *E. coli* foi positiva para o gene *iuc* que codifica aerobactina, sideróforo produzido em condições de baixa disponibilidade de ferro no fluido corpóreo e nos tecidos de vertebrados. Este

marcador de virulência geralmente é encontrado em afecções urinárias e/ou septicêmicas em humanos, como pielonefrite, cistite ou bacteremia, denotando maior participação deste fator de virulência nas infecções extra-intestinais por *E. coli* (GARCIA e LE BOUQUÉNEC, 1996; TORRES et al., 2001).

Somente em uma linhagem foram identificados os genes *papGI*, *sfa*, e *hly*. PapGI é um dos alelos da adesina PapG presente na fímbria P, identificado geralmente em isolados de fezes (BERGSTEN et al., 2005). O gene *sfa* codifica a fímbria S que está associada a casos de septicemia, meningite neonatal e pielonefrite (MULVEY, 2002). As linhagens hemolíticas predominam em afecções extraintestinais, como infecções do trato urinário, septicemias e meningites neonatais (ISLAND et al., 1998). Tiba et al. (2008), no Brasil, identificaram a associação dos genes *papG*, *sfa*, *iucD* e *hly* em pacientes humanos com cistite, reforçando a preocupação com os achados do presente estudo, em face da contaminação ambiental por linhagens patogênicas de *E. coli* em ambientes de recreação humana.

A classificação filogenética das linhagens isoladas de *E. coli* identificou o predomínio dos grupos A e B1, representados principalmente por *E. coli* comensais. Tal achado pode ser creditado à presença deste microrganismo na microbiota entérica de animais e humanos (SUSMANN, 1997).

A contagem de coliformes e *E. coli* tem sido utilizada como indicador de contaminação fecal, que auxilia na adoção de medidas que visam reduzir a contaminação de alimentos, equipamentos e ambientes. A presença de coliformes e *E. coli* foi observada ao longo de todas as estações do ano no decorrer do presente estudo, atingindo valores máximos de até  $10^3$ , mostrando diferença estatística somente na contagem de *E. coli*, notadamente nos meses de fevereiro e maio. Curiosamente, as contagens de coliformes totais e *E. coli* encontradas nos ambientes recreacionais podem ser consideradas baixas quando comparadas aos limites máximos permitidos para esses microrganismos em certos grupos de alimentos. No entanto, não existem padrões sanitários oficiais de qualidade da areia de praças ou parques, quais sejam microbiológicos, parasitológicos e/ou virológicos, que estabeleçam limites quantitativos e/ou qualitativos. Os critérios que mais se aproximam são os utilizados para a avaliação de balneabilidade das praias estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1986). Esses critérios

estabelecem que, para recreação de contato primário, as águas devem apresentar limites máximos de coliformes totais até 5.000 NMP/100mL e coliformes fecais até 1.000 NMP/100mL. Para a areia de praia, Mendes et al. (1993), em Portugal, propuseram como critério de qualidade microbiológica número máximo de  $10^5$  NMP/100g de coliformes fecais. Beversdorf et al. (2007) investigaram a presença de *E. coli* em amostras de areia de praia nos EUA, e o valor médio diário encontrado foi entre 6.700 a 40.900/100 UFC/g de areia. Apesar de estudos pontuais no Brasil voltados à avaliação da areia de praia, pouca atenção tem sido dada à qualidade sanitária da areia de parques recreacionais. Contudo, a presença de coliformes e *E. coli* ao longo de todo o período amostral do estudo é forte indicador de contaminação fecal do ambiente dos parques e praças. Este achado reforça a necessidade de adoção de procedimentos de higienização nos locais que possuem caixas de areia como a substituição da areia e/ou restrição de acesso de animais domésticos, com vistas a reduzir a contaminação desses ambientes e, conseqüentemente, minimizar os riscos de infecção dos usuários por bactérias entéricas.

Larva migrans visceral é reconhecida como uma das zoonoses mais freqüentes nos humanos, causada por migração errática de estágios larvais de parasitas intestinais do gênero *Toxocara*, comumente encontrados em animais de companhia. No Brasil, estudos conduzidos em certos estados têm revelado de forma preocupante a contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* sp. em ambientes de recreação infantil, alertando para a importância deste achado no contexto de saúde animal e de Saúde Pública (CÔRREA et al., 1995; SANTARÉM et al., 1998; ARAUJO et al., 1999). No presente estudo, foram encontrados ovos do parasito somente na primeira colheita, em dois locais públicos e um privado. Ao contrário, Costa-Cruz et al. (1994) investigaram a freqüência de contaminação de praças públicas de Uberlândia, MG, por ovos de *Toxocara* sp em amostras de areia, e encontraram o parasita em 23% da amostragem. Em Santa Maria, RS, foi encontrado acima de 90% das praças recreacionais contendo ovos do gênero *Toxocara* (CÔRREA et al., 1995). Santarém et al. (1998) encontraram ovos de *Toxocara* sp em 17,5% de amostras de parques e praças públicas do município de Botucatu, SP, predominantemente nos meses de primavera e verão. Araujo et al. (1999) avaliaram setenta e quatro praças públicas em Campo Grande, MS, e

identificaram ovos de *Toxocara* spp em oito (10,8%) praças. A baixa ocorrência observada do parasita nos locais amostrados, comparativamente aos demais estudos, pode ser reflexo de maior conscientização dos proprietários do município-alvo quanto à posse responsável dos animais de companhia, incenivados por ações educativas da FMVZ e/ou pela ação dos médicos veterinários de clínicas locais, particularmente quanto à necessidade de vermifugação dos cães e gatos, notadamente nos filhotes de até um ano de idade, fato que minimizaria a eliminação fecal de ovos do parasita nos ambientes estudados.

Nos parques e praças amostrados foi identificado material genético de coronavírus bovino na areia de uma das praças públicas. À semelhança dos demais enteropatógenos encontrados, tal achado pode ser atribuído ao acesso facilitado de animais no local, ao uso de areia previamente contaminada ou à veiculação do agente na sola dos calçados dos usuários. A identificação de coronavírus sinaliza para a contaminação fecal do ambiente recreacional estudado e, conseqüentemente, para a necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias e de controle de acesso de animais nos parques e praças.

Os estudos com a coronavirose estão restritos a identificação do vírus em humores orgânicos de animais e humanos, ou de ambientes de criação de animais. São pontuais ou praticamente inexistentes as descrições envolvendo a presença do agente no ambiente, tampouco de recreação humana. Derbyshire e Brown (1978) isolaram coronavírus de dejetos de uma criação de engorda de suínos. Entretanto, não obtiveram êxito no isolamento viral do solo de propriedades que utilizavam dejetos de suínos na adubação agrícola.

No presente estudo não foram identificados *Salmonella* sp., *T. gondii* e *Rotavírus*. Em contraste, Vieira et al. (2001) encontraram *Salmonella* sp. em areia seca e úmida de três praias de Fortaleza, CE, das quais uma amostra de areia seca e uma de areia úmida. Lass et al. (2009) identificaram, na Polônia, 18 amostras de areia e esgoto contendo oocistos de *T. gondii* utilizando as técnicas de flutuação e PCR. A ausência de identificação de *Salmonella* sp., *T. gondii* e *Rotavírus* nos locais amostrados, comparativamente aos estudos supracitados, poderia ser creditado às diferenças nos métodos diagnósticos empregados, no acesso de animais nos ambientes ou à procedência da areia utilizada nos ambientes recreacionais.

A presença de *E. coli*, *R. equi*, *Toxocara* sp. e *Coronavírus* nos parques e praças amostrados sinaliza para a contaminação fecal do ambiente por animais, de companhia e/ou produção. De posse dos resultados, há necessidade de prestar orientações aos responsáveis pelos locais públicos e privados, quanto à adoção de medidas factíveis que possam minimizar a contaminação fecal dos ambientes recreacionais.

Segundo o Projeto de lei nº 2.297, de 2003 (BRASIL, 2009), os municípios e instituições responsáveis por áreas de lazer públicas e privadas são obrigados a adotarem medidas de prevenção e controle da contaminação dos tanques de areia por patógenos de potencial zoonótico. Neste projeto de lei, recomenda-se a troca periódica da areia dos tanques, a pesquisa regular de ovos e larvas de helmintos a cada troca de areia, a instalação de telas ao redor do ambiente para dificultar o acesso de animais, a redução da umidade dos tanques pela reviragem da areia e a cobertura da caixa de areia com lonas durante os períodos de inatividade recreacional. Ademais, preconiza-se também rastelar e retirar diariamente possíveis dejetos de animais antes do início das atividades recreacionais.

A Organização Mundial da Saúde recomenda também para o controle específico da toxocaríase na população canina e felina, o tratamento anti-helmíntico dos animais nas primeiras semanas de vida dos filhotes, além da vermifugação das fêmeas antes da prenhez, como profilaxia da transmissão do parasita via transplacentária e pelo colostro (BARRIGA, 1991).

A presença de diferentes enteropatógenos encontrados ao longo de todo o período amostral indica que se faz necessário definir parâmetros ou indicadores das condições sanitárias da areia/solo dos parques e praças recreacionais, com vistas a reduzir os riscos de transmissão de doenças veiculadas pelas fezes dos animais para os humanos, principalmente para crianças, que se constituem no grupo de risco mais vulnerável aos enteropatógenos que podem ser veiculados nestes ambientes recreacionais.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo os resultados permitiram concluir que:

✓ A identificação de *R. equi*, *E. coli*, *Toxocara* sp. e *Coronavírus* são indicadores de contaminação ambiental por enteropatógenos de potencial zoonótico, veiculados pelas fezes de animais domésticos, necessitando que sejam adotadas medidas de prevenção e controle da contaminação ambiental nos parques e praças estudados;

✓ A detecção de linhagens avirulentas de *R. equi* no ambiente de recreação humana denota preocupação em Saúde Pública, em virtude da ocorrência da rodococose em humanos por estirpes avirulentas, particularmente em indivíduos acometidos pelo vírus da Aids;

✓ Não foram identificadas linhagens de *E. coli* verotoxigênicas e/ou do sorotipo O157:H7 nos ambientes amostrados, embora as investigações destas linhagens patogênicas em animais, em humanos, nos alimentos e no ambiente possam contribuir na vigilância epidemiológica da doença, em face da extrema gravidade dos casos clínicos, notadamente em crianças;

✓ A detecção dos genes *eae* e *bfp* presentes em linhagens de *E. coli* reforça a preocupação em Saúde Pública do uso dos ambientes recreacionais amostrados, em virtude do predomínio de infecções entéricas em crianças com menos de um ano de idade por esta classe patogênica de *E. coli*;

✓ A detecção de linhagens de *E. coli* detentoras dos genes *papGI*, *sfaS*, *hly* e *iucD* também sinaliza para os riscos de uso dos ambientes recreacionais estudados, visto que estes fatores de virulência da bactéria estão comumente relacionados às afecções genito-urinárias em humanos;

✓ O gene *saa* da adesina autoaglutinante foi encontrado em 12 (19%) linhagens de *E. coli* isoladas dos ambientes recreacionais, embora novos estudos sejam necessários no sentido de aquilatar a importância deste fator de

virulência nas infecções por *E. coli* em humanos e animais;

✓ A presença de ovos de *Toxocara* sp. nos parques e praças reforça a preocupação em Saúde Pública para os usuários, particularmente crianças, e indica a necessidade de limitar ou mesmo impedir o acesso de cães e gatos nos ambientes estudados, além de promover a retirada periódica das fezes destes animais antes do início das atividades recreacionais;

✓ A detecção de gene de coronavírus bovino no ambiente de uma praça recreacional é achado incomum na literatura consultada, embora também sinaliza para a contaminação fecal do ambiente estudado;

✓ A presença de diferentes enteropatógenos nos ambientes estudados reforça para a necessidade de se estabelecer padrões sanitários para a areia/solo de parques e praças recreacionais, que envolvam limites quantitativos e/ou qualitativos, visando reduzir os riscos de transmissão de doenças veiculadas pelas fezes de animais para os humanos.

**REFERÊNCIAS\***

ABE, K.; SHIMOKAVA, H.; KUBOTA, T; NAWA, Y; TAKESHITA, A. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. *Intern. Med.*, v.41, n.9, p.706-708, 2002.

ABE-JACOB, C.M.; CHIEFFI, P.P.; PERES, B.A. Larva migrans visceral por *Toxocara canis* (Toxocaríase). In: MARCONDES, E. *Pediatria Básica*. São Paulo: Sarvier, 1991. p.1063-1065.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedad transmissibles communes al hombre y a los animais*. Organización Panamericana de la Salud. *Publicación Científica e Técnica*. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 413p.

ADAL, K.A.; SHINER, P.T.; FRANCIS, J.B. Primary subcutaneous abscess caused by *Rhodococcus equi*. *Ann. Intern. Med.*, v.122, n.4, p.317, 1995.

AKASHI H.; INABA Y.; MIURA Y.; TOKUHISHA S.; SATO K.; SATODA K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Vet. Microbiol.*, v.5, p.265-276, 1980.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborn diseases. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n.3, p.1-12, 1997.

ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R. M. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bacteriological Analytical Manual*. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.5001-5020.

---

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of Multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.12, p.5849-5853, 2004.

ARAÚJO, F.R.; CROCCI, A.J.; RODRIGUES, R.G.; AVALHAES, J.D.; MIYOSHI, M.I.; SALGADO, F.P.; da SILVA, M.A.; PEREIRA, M.L. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.32, n.5, p.581-583, 1999.

BÄCHLI, H.; MINET, J.C.; GRATZL, O. Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. *Child's Nerv. Syst.*, v.20, n.7, p.468-472, 2004.

BARRIGA, O.O. Rational control of canine toxocaríases by the veterinary practitioner. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.198, n.2, p.216-221, 1991.

BARRIGA, O.O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocaríases and the possibilities of immunological control. *Vet. Parasitol.*, v.29, n.2-3, p.195-234, 1988.

BECU, T.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from 5 horsebreeding farms in Argentina. *J. Equine Sci.*, v.11, p.23-27, 2000.

BERGSTEN, G.; WULLT, B.; SVANBORG, C. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.295, n.6, p.487-502, 2005.

BEVERSDORF, L.J.; BORNSTEIN-FORST, S.M.; McLELLAN, S.L. The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off. *J. App. Microbiol.*, v.102, n.5, p.1372-1381, 2007.

BIRNBOIM, T.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, v.7, n.6, p.1513–1523, 1979.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOIA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afã adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Res. Microbiol.*, v.148, n.9, p.745-55, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSALOBRE, C.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; JUÁREZ, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Meth.*, v.26. p.95-101, 1996.

BONILLA, T. D.; NOWOSIELSKI, K.; CUVELIER, M.; HARTZ, A.; GREEN, M.; ESIÖBU, N.; MCCORQUODALE, D. S.; FLEISHER, J. M.; ROGERSON, A. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Mar. Pollut. Bull.*, v.54, n.9, p. 1472-1482, 2007.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, v.39, n.11, p.1673-1680, 2001.

BRANDÃO P.E.; GREGORI F.; VILLARREAL L.Y.B.; ROSALES C.A.R.; SOARES R.M. & JEREZ J.A. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis. *Virus Rev. Res.*, v.10, p.45-49, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dados e Pesquisas em Doenças Sexualmente Transmissíveis e aids. Net. set. 2007. Disponível em: <[www.aids.gov.br/](http://www.aids.gov.br/)> Acesso em: 10 set. 2007.

BRASIL. Projeto de lei da Câmara n. 110, de 2009 (Projeto de lei original 2.297/2003). *Diário do Senado Federal*, da Casa de Origem, do Deputado Neucimar Fraga, 10 de jun. 2009, p.22830. Disponível em:

<<http://www.senado.gov.br/sf/publicacoes/diarios/pdf/sf/2009/06/09062009/22830.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2009.

BROWN, A.E. Other *Corynebacteria* and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.1872-1877.

BUSCH, U.; HORMANSDORFER, S.; SCHRANNER, S. HUBER, I.; BOGNER, K.H.; SING, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* coll excretion by child and her cat. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, n.2, p.348-349, 2007.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215-228.

CAPITANI, G.; EIDAM, O.; GLOCKSHUBER, R.; GRÜTTER, M. G. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* v.8, n.8, p.2284-90, 2006.

CASTRO, A.F.P.; YANO, T. Principais doenças entéricas dos bezerros de origem bacteriana. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. *Diarréia dos bezerros*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p.1-38.

CARDOSO, D.; MARTINS, R.M.B.; KITAJIMA, E.W.; BARBOSA, A.J.; CAMAROTA, S.C.T.; AZEVEDO, M.S.P. *et al.* Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizados com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop.São Paulo.* v.34, n.5, p.433-439, 1992.

CATERINO-DE-ARAÚJO, A.; DE LOS SANTOS-FORTUNA, E.; ZANDONA-MELEIRO, M.C.; CALORE, E.E.; PEREZ CALORE, N.M. Detection of the 20-kDa virulence-associated antigen of *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion

in pleural tissue obtained from an AIDS patient. *Pathol. Res. Pract.*, v.196, n.5, p.321-327, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Rotavirus surveillance: United States, 1989-1990. *MMWR Morb Mort Wkly Rep*, v.40, p.80-81, 87, 1991.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.70, n.1, p.111-121, 1999.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *App. Environ. Microbiol.*, v.66, n.10, p.4555-4558, 2000.

COELHO, L.M.P.S.; DINI, C.Y. ; MILMAN, M.H.S.A.; OLIVEIRA, S.M. *Toxocara* spp eggs in public squares of Sorocaba, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.São Paulo*, v.43, n.4, p.189-191, 2001.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA (1986). Resolução Nº 20 de 18 de junho de 1986.

CORRÊA, G.L.B.; MICHELON, E.; LAGAGGIO, V.R.A.; MOREIRA, W.S.; MORAES, R.Q.; LEITE, C.R. et al. Contaminação do solo por ovos, larvas de helmintos e oocistos de protozoários, em praças públicas de Santa Maria e sua importância em saúde pública. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.*, v.4, p.137, 1995.

COSTA-CRUZ, J.M.; NUNES, R.S.; BUSO, A.G. Presence of *Toxocara spp* eggs in public squares of Uberlandian city, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.36, n.1, p.39-42, 1994.

DAIGLE, F., HAREL, J., FAIRBROTHER, J.M., LEBEL, P. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa- encoded fimbrial adhesion system among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, v.40, n.4, p.286-291, 1994.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COLUMBIER, D. et al. *Epi Info Version 6. A Word Processing, Database and Statistical Program for Epidemiology on Microcomputers*. Atlanta: CDC, 1994. 601p.

DERBYSHIRE, J.B.; BROWN, E.G. Isolation of animal viruses from farm livestock waste, soil and water. *J. Hyg.*, v.81, n.2, p.295-302, 1978.

DE LEENER, K.; RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; HOOVELS, L.V.; GOEGEBUER, T.; VAN DER DONCK, I.; VAN RANST, M. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology*, v.325, p.11-17, 2004.

DE RICKE, J.; GONZALEZ, E.A.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BLANCO, M.; BOIVIN, R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.4, p.694-699, 1990.

DE SOUZA, R.L.; NISHIMURA, L.S.; GUTH, B.E. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.59, n.2, p.223-225, 2007.

DOORDUYN, Y.; VAN DEN BRANDHOF, W.E.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.; WANNET, W.J.; VAN PELT, W. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium (DT104 e não DT104) infections in the Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections. *Epidemiol. Infect.*, v.134, n.3, p.617-26, 2006.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.12, n.1, p.289-302, 1991.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.205, n.11, p.1593-98. 1994.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988.

ESPINOZA, Y.R.M.A., HUAPAYA, P., AYLLÓN, C., SEVILLA, C., HUIZA, A., JIMÉNEZ, S. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. *Anales de la Facultad de Medicina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. v. 64, n. 4, p. 247-251, 2003.

ESTES, M.E; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: *Fields Virology*, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1918-1976.

EUMANAMA, A.A.; FAHD, M.I.; AFIFI, S.; ABDALLAH, S.; BAHR, S. Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. *Environ. Res.*, v.99, n.1, p.1-10, 2005.

FAITH, N.G.; SHEER, J.A.; BROSH, R. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *App. Environ. Microbiol.*, v.62, n.1, p.1519-1525, 1996.

FARIAS, M.R.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M.G.; FABRIS, V.E.; FRANCO, S.R.V.S. Cutaneous pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87-kb type I plasmid. *Aust. Vet. J.*, v.85, n.1-2, p.29-31, 2007.

FARIAS, M.R.; RIBEIRO, M.G.; ROCHA, A.A.F.; MACHADO, L.H.A.; FRANCO, S.R.V.S.; FABRIS, V.E.; PAES, A.C. Secondary chronic cutaneous pyogranuloma produced by *Rhodococcus equi* in a cat. First report in Brazil. In: CONGRESSO DE LA ASOCIACIÓN MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMALES, 23., 1998. *Anais...* Buenos Aires, 1998. p. 809.

FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed da UFSM, 2007. 888p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.33-81.

FREYRE, A. *Toxoplasmosis em lãs espécies domésticas y como zoonosis*. Montevideo: Universidad de La Republica, 1989. 332p.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: \_\_\_\_\_ VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds). *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p.1290 – 1305.

FUNASA. Surto de toxoplasmose no município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná. Boletim eletrônico epidemiológico. Ano 2, nº 3, 20/08/2002. Disponível:[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_03\\_ano02.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_03_ano02.pdf). Acesso em 28/08/2007.

GANNON, V.P.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E.J. . Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, Canada, v.31, n.5, p.1267-1274, 1993.

GARCIA, M.I.; JOUVE M.; NATARO, J.P.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, v.479, n.3, p.111–117, 2000.

GARCIA, M.I.; LE BOUGUÉNEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrheogenic *Escherichia coli*. *Bull. Inst. Pasteur*, v.94, p.201-236, 1996.

GLASS, R.I.; LEW, J.F.; GANGAROSA, R.E. Estimates of morbidity and mortality rates for diarrheal diseases in American children. *J. Pediatrics*, v.118, p.27-33, 1991.

GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3.ed. Philadelphia: Saunders Company, 2006. 1386p.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, v.13, n.1, p.60-68, 1991.

GUNDY, P.M.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food Environ. Viral.*, v.1, p.10-14, 2009.

GUNZBURG, S.T.; TORNIÉPORTH, N.G.; RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.5, p.1375-1377, 1995.

HAMIDOU, M.A.; FRADET, G.; KADI, A.M.; ROBIN, A.; MOREAU, A.; MAGNAVAL, J.F. Sistemic vasculitis with lymphocytic temporal arteritis and *Toxocara canis* infection. *Arch. Inter. Med.*, v.162, n.13, p.1521-1524, 2002.

HAYASHI, M.; YAMAMOTO, K.; HAYASHI, H. Montly variation of viable count and coliforms count of sandpits in parks. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, v.39, n.1, p.45-49, 1992.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained poliacylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

HEUVELINK, A.E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.; VAN OOSTEROM, R.; EDINK, K.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.; DE BOER, E. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol. Infect.*; v.129, n.2, 295-302, 2002.

HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.*, v.56, p.177-185, 1997.

HOLLEY, R.A.; ARRUS, K.M.; OMINSKI, K.H.; TENUTA, M.; BLANK, G. Salmonella survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *J. Environ. Qual.*, v.35, n.4, p.1170-1180, 2006.

IBGE-SEADE. Censo Demográfico Botucatu, 2006. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br>>. Acesso em: 23 ago. 2007.

ISLAND, M.D.; CUI, X.; FOXMAN, B.; MARRS, C.F.; STAMM, W.E.; STAPLETON, A.E; WARREN, J.W. Cytotoxicity of Hemolytic, Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Positive and -Negative *Escherichia coli* to Human T24 Bladder Cells. *Infect. Immun.*, v.66, n.7, p.3384-3389, 1998.

JENKINS, C.; PERRY, N.T.; CHEASTY, T.; SHAW, D.J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G.J.; SMITH, H.R.; PATON, A.W.; PATON, J.C. Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J. Clin. Microbiol.* v.41, n.4, p.1775–1778, 2003.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 87, n.20, p. 7839–7843, 1990.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

JONES, J.L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; MCQUILLAN, G.; NAVIN, T.; MC AULEY, J.B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am. J. Epidemiol.*, v.154, n.4, p.357–365, 2001.

JUNKINS, A.D.; DOYLE, M.P. Comparison of adherence properties of *Escherichia coli* O157:H7 and a 60-megadaltonplasmid-cured derivative. *Curr. Microbiol.*, v.19, n.1, p.21-27, 1989.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev.*, v.2, p.123-140, 2004.

KARKKAINEN, U.M.; KAUPPINEN, J.; IKAHEIMO, R.; KATILA, M.L.; SIITONEN, A. - Rapid and specific detection of three different G adhesin classes of P-fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Method.*, v.34, n.1, p.23-29, 1998.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. *Bergey's manual of sistematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984 p.

LANDGRAF, M.; MARQUES, P.A.H.F.; SAAD, S. *Escherichia coli* O157:H7. Virulência, epidemiologia e métodos de detecção em alimentos. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS-COMBHAL, 1998. Apostila.

LASS, A.; PIETKIEWICZ, H.; MODZELEWSKA, E.; DUMETRE, A.; SZOSTAKOWSKA, B.; MYJAK, P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.28, n.6, p.599-605, 2009.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.*, v.155, n.3, p.377-389, 1987.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: Two "Coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n.2, p.1-10, 1997.

MACEDO, V.O. Toxoplasmose. In: \_\_\_\_\_ CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; RESENDE, J.M. *Protozooses Humanas*. Fundação BYK. 10. 1994. p.153-170.

MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; SEKIMOTO, R.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; VARGA, J.; FODOR, L.; SOLYMOSI,

N.; MAJOR, A. Characterization of virulence plasmids in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet. Microbiol.*, v.88, n.4, p.377-384, 2002.

MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.92, n.5, p.1664-8, 1995.

MEIRELES, L.R.; GALISTEO, A.J.Jr.; POMPEU, E.; ANDRADE, H.F.Jr. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Trop. Med. Int. Health.* v.9, n.8, p.876-81, 2004.

MELAMED J. Títulos dos anticorpos específicos na toxoplasmose ocular. *Arq. Bras. Oftalm.*, v.45, n.2, p.87-90, 1982.

MENDES, B.; NASCIMENTO, M.J.; OLIVEIRA, J.S. Preliminary characterisation and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. *Water Sci. Technol.*, v.27, n.3-4, p.453-456, 1993.

MORIMATSU, Y.; AKAO, N.; AKIYOSHI, H.; KAWAZU, T.; OKABE, Y.; AIZAWA, H. Case reports: a familial case of Visceral Larva Migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.2, p.303-306, 2006.

MULVEY, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, v.4, n.5, p.257-271, 2002.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studies from the perspective of genogroup. *Microbiol. Immun.*, v.37, p.337-348, 1993.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELEY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect. Immun.* v.58, n.1, p.279–281, 1990.

NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Dis.* v.183, n.1, p.24-7, 2001.

NUNES, C.M. Epidemiologia e controle da toxocaríase. *Cães gatos.*, v.10, p.10-15, 1995.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – OPS. Rodococosis. *In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis.* 3.ed. Washington: OPS (Publicación Científica y Técnica no. 580), 3v., 2001. p.236–239.

OVERGAAUW, P.A. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. *Rev. Microbiol.*, v.23, n.3, p.215-231, 1997.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.1, p.271–274, 2002.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.*, v.69, n.11, p.6999–7009, 2001.

PENA, H.F.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Sci.*, v.81, n.1, p.58-67, 2006.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. *Centre Collaborateur OMS de référence et de recherches pour les Salmonella*, 1992. p.145.

PRATLONG, F; BOULOT, P; ISSERT, E. Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. *Prenat. Diagn.*, v.14, n.3, p.191-198, 1994.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.4, n.1, p.20-34, 1991.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K; CARTER, M. E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed 2005. 512 p.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe, 1994. p.137–143.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with *Escherichia coli*. In: RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 10. ed. London: W. B. Saunders, 2007. p.847-848.

RAHAL, K.; KODJO, A.; GRETZEL, D.; RICHARD, Y. Isolation of a new type of virulence plasmid DNA in *Rhodococcus equi* strains from horses and equine environments in France. *Rev. Med. Vet.*, v.150, p.349–352, 1999.

RIBEIRO, M.G.; FERNANDES, M.C.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K.; PINTO, J.P. A.N.; BORGES, A.S. Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, n.2, p.\_\_, 2010 (no prelo).

RIBEIRO, M.G. Fatores de virulência em linhagens de *Rhodococcus equi* isolados de equinos, suínos e humanos (Livre Docência – Tese). Universidade Estadual Paulista, 2008, 66p.

RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES, M.C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose nos animais e no homem. *Vet. e Zootec.*, v.14, n. 2, p.1-8, 2007.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTORIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

RIBEIRO, M.G.; BRITO, C.J.C.; PAES, A.C.; MEGID, J.; PINTO, J.P.A.N.; LISTONI, F.J.P. Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. Relato de caso. *Clin. Vet.*, v.8, n.43, p.30-37, 2003.

RIBEIRO, M.G.; SILVA, E.O.T.R.; PINTO, J.P.A.N. *Escherichia coli* O157:H7 de hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. *Rev. Hig. Alim.*, v.13, n.66-67, p.88-99, 1999.

ROBINSON, A.; TANNIER, C.; MAGNAVAL, J.F. *Toxocara canis* menigoradiculitis. *Revue Neurologique*, v.158, n.3, p.351-353, 2002.

RUSSO, T.A.; MCFADDEN, C.D.; CARLINO-MACDONALD, U.B.; BEANAN, J.M.; BARNARD, T.J.; JOHNSON, J.R. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.70, n.12, p.7156–7160, 2002.

SANSONETTI, P. New aspects of intestinal bacterial invasion. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, v.26, n.5, p.24-31, 2002.

SALEM, G.; SCHANTZ, P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin. Infect. Dis.*, v.15, n.4, p.743-744, 1992.

SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F.; BERGAMO F.M.M. Contaminação por ovos de *Toxocara* spp. em parques e praças públicas de Botucatu, SP, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, n.6, p.529-532, 1998.

SANTARÉM, V. A.; GIUFFRIDA, R.; ZANIN, G. A. Larva migrans cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.37, n.2, p.179-181, 2004.

SCALETSKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; SILVA, S.O.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, n.8, p.855-8, 2002.

SCHANTZ, P. Toxocara larva migrans now. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41, p.21-34, 1989.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SCHUTZE, G. E.; SIKES, J. D.; STEFANOVA, R.; CAVE, M. D. The home environment and Salmonellosis in children. *Pediatrics*, v.103, n.1, p.1-5, 1999.

SCOTT, L.; MCGEE, P.; WALSH, C.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; BLANCO, J.; KARCZMARCZYK, M.; EARLEY, B.; LEONARD, N.; SCHERIDAN, J.J. Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet. Microbiol.*, v.134, n.3-4, p.288-293, 2009.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.*, v.60, n.1, p.167-215, 1996.

SEVERO, L.C.; RITTER, P.; PETRILLO, V.F.; DIAS, C.A.G.; PORTO, N.S. Infecção pulmonar por *Rhodococcus equi*: relato dos dois primeiros casos brasileiros. *J. Pneumol.*, v.27, n.3, p.158-162, 2001.

SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Rodococoses. In: VERONESI, R; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 2v, 1996. p.1032-1033.

SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; LIMA, V.Y.; MORETTI, L.D.; PINHEIRO, J.P.; TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Vet. Parasitol.*, v.127, n.1, p.29-33, 2005.

SAWICKI, S.G.; SAWICKI, D.L.; SIDDELL, S.G. A contemporary view of *Coronavirus* transcription. *J. Virol.*, v.81, n.1, p.20-29, 2007.

STEPHENSON, C.B.; CASEBOLT, D.B.; GANGOPADHYAY, N.N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Research*, v.60, p.181-189, 1999.

STEYER, A.; POLJISAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.*, v.89, p.1690-1698, 2008.

SUBAUSTE, C.S; REMINGTON, J.S. Toxoplasmose. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. *Tratado de Medicina Interna*. 20 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan 2. 1997. p.2106–2109.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. United Kingdom: Cambridge University, 1997. 639p.

TAKAI, S.; MARTENS, R.J.; JULIAN, A.; RIBEIRO, M.G.; FARIAS, M.R.; SASAKI, Y.; INUZUKA, K.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; PRESCOTT, J.F. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.9, p.4468-4470, 2003.

TAKAI, S.; THARAVICCHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TRINARONG, C.; ROJANASTHIEN, S.; SIRIMALAISUWAN, A.; TESAPRATEEP, T.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.66, n.1, p.52-55, 2002.

TAKAI, S.; MURATA, N.; KUDO, R.; NAREMATSU, N.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. *Rhodococcus equi* pneumonia in a crossbred foal in Kumamoto: clinical isolates contained new virulence plasmids, 90-kb type III and type IV. *Vet. Microbiol.*, v.82, p.373-381, 2001.

TAKAI, S.; CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D.; HARA, M.; NAKAMURA, M.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; MARTENS, R. J. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from 5 *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, p.489-494, 2001a.

TAKAI, S.; SHODA, M.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; FORTIER, G.; PRONOST, S.; RAHAL, K.; BECU, T.; BEGG, A.; BROWNING, G.; NICHOLSON, V.M.; PRESCOTT, J.F. Restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3417-3420, 1999.

TAKAI, S.; TAKEDA, K.; NAKANO, Y.; KARASAWA, T.; FURUGOORI, J.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HIGUCHI, T.; ANZAI, T.; WADA, R.; KAMADA, M. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in a infected foal. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.7, p.1904-1908, 1997.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCHIAI, S.; SAKAI, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v.58, n.7, p.669-672, 1996.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OSAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15–to 17–kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.6, p.1624–1627, 1995a.

TAKAI, S.; IMAI, Y.; FUKUNAGA, N.; UCHIDA, Y.; KAMISAWA, K.; SASAKI, W.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulence–associated plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, v.172, n.5, p.1306–1311, 1995b.

TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T.; OZAWA, T.; MATSUKURA, S.; TAMADA, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence–associated plasmids in *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.7, p.1726–1729, 1993.

TAKAI, S.; SEKIZAKI, T.; OZAWA, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, W.; TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15– to 17–kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.*, v.59, n.11, p.4056–4060, 1991.

TALVIK, H.; MOKS, E.; MAGI, E.; JARVIS, T., MILLER, I. Distribution of *Toxocara* infection in the environment and in definitive and paratenic hosts in Estonia. *Act. Vet. Hung.*, v.54, n.3, p.399-406, 2006.

TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, v.20, n.1, p.1-10, 1995.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n.4, p.1-13, 1997.

TENTER, A.M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, v.23, n.6, p.391, 1999.

TIBA, M.R.; YANO, T.; LEITE, Dda.S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, v.50, n.5, p.255-260, 2008.

TIBA, M.R. *Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de Escherichia coli isoladas de cistites*. 2004. 72f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TORRES, A.G.; REDFORD, P.; WELCH, R.A.; PAYNE, S.M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect. Immun.* v.69, n.10, p.6179–6185, 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, n.5, p.508–513, 2002.

TKACHUK-SAAD, O.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, p.2696–2700, 1991.

TREVEJO, R.T.; COURTNEY, J.G.; STARR, M.; VUGIA, D.J. Epidemiology of Salmonellosis in California, 1990-1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am. J. Epidemiol.*, v.157, n.1, p.48-57, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. App. Microbiol.*, v. 82, n.1, p.537-551, 1997.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo. Editora Atheneu Rio, 2005. 3522p.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo. Editora Atheneu, 1996. 2167p.

VERVILLE, T.D.; HUYCKE, M.M.; GREENFIELD, R.A.; FINE, D.P.; KUHL, T.L.; SLATER, L.N. *Rhodococcus equi* infections in humans. *Medicine*, v.73, n.3, p.119-132, 1994.

VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGUES, D.P.; MENEZES, E.A.; EVANGELISTA, N.S.S.; REIS, E.M.F.; BARRETO, L.M.; GONÇALVES, F.A. Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p.77-80, 2001.

VON SYDON, A.C.M.; DEL, G. *Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de Escherichia coli em fezes de cães errantes*. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.12, n.2, p. 85-90, 1995.

YUYAMA, T.; YUSA, S.; YOSHIZUMI, K.; YAMANO, S.; MURATA, S.; HIROSE, T.; OSANAI, R.; ONISHI, Y.; OSATO, S.; SASAKI, C.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSIBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in thoroughbred horses in Kagoshima. *J. Vet. Med. Sci.*, v.64, p.715–718, 2002.

WHITE, R.G.; MEBUS, C.A.; TWIEHAUS, M.J. Incidence of herds infected with a neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV). *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.65, p.487-490, 1970.

WIWANITKIT, V.; WAENLOR, W. The frequency rate of *Toxocara* species contamination in soil samples from public yards in a urban area “Payathai”, Bangkok, Thailand. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.46, n.2, p.113-114, 2004.

WOOLCOCK, J.B.; FARMER, A.M.T.; MUTIMER, M.D. Selective medium for *Corynebacterium equi*. *J. Clin. Microbiol.*, v.9, p.640–642, 1979.



1  
2 **Key words:** *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Toxocara* sp., *Toxoplasma*  
3 *gondii*

4  
5 **ENTEROPATÓGENOS DE POTENCIAL ZONÓTICO, IDENTIFICADOS EN EL**  
6 **SUELO/ARENA DE PARQUES/PLAZAS DE RECREACIÓN HUMANA**

7  
8 **RESUMEN**

9 Los enteropatógenos pueden ser considerados como uno de los grupos principales de  
10 microorganismos patogénicos para el ser humano y los animales. Establecen la infección en  
11 los susceptibles por medio de la contaminación de alimentos y agua o por el contacto estrecho  
12 con los animales o con el ambiente de la creación. En Brasil y otros países es común el uso de  
13 cajas de arena en parques y plazas de recreación para el entretenimiento, especialmente de  
14 niños y de adolescentes. Estos lugares pueden ser propicios y de de riesgo elevado a la  
15 veiculación de los enteropatógenos para el ser humano cuando medidos general de higiene no  
16 son tomados. En este artículo algunos enteropatógenos del origen bacteriano y parasitario  
17 fueron revisados que pueden ser considerados indicadores de la contaminación ambiental para  
18 el ser humano de los ambientes de recreación, como parques y plazas.

19  
20 **Palabras-claves:** *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Toxocara* sp.,  
21 *Toxoplasma gondii*

22  
23 **INTRODUÇÃO**

24 Os patógenos de veiculação entérica podem ser considerados como uma das principais  
25 classes de microrganismos patogênicos para humanos e animais. Este grupo peculiar de  
26 organismos caracteriza-se por se manterem viáveis e com capacidade infectante em condições  
27 adversas do ambiente, após a eliminação fecal pelos animais. Em sua grande maioria,  
28 estabelecem infecção nos susceptíveis mediante a contaminação de alimentos de origem  
29 animal, água, verduras e frutas. O contato estreito com animais, especialmente de companhia,  
30 ou mesmo com o ambiente de criação ou habitat dos animais, também representa elos na  
31 cadeia epidemiológica de transmissão de enteropatógenos dos animais para humanos (1).

1           No Brasil e em outros países é comum o uso de caixas de areia/solo em parques e  
2 praças de recreação para o entretenimento, especialmente de crianças e adolescentes. O acesso  
3 de animais domésticos e aves, a deficiente higienização dos locais, o hábito de geofagia ou  
4 precária higiene pessoal de crianças, e a falta de conscientização da população em geral  
5 quanto aos riscos representados por microrganismos entéricos, torna estes locais propícios e  
6 de alto risco à veiculação de enteropatógenos para humanos. Dentre os patógenos de animais  
7 domésticos de veiculação fecal, com atributos de reconhecida resistência ambiental e  
8 potencial zoonótico, relacionados a graves doenças em humanos, destacam-se: *Rhodococcus*  
9 *equi* (*R. equi*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*),  
10 *Toxocara* sp. (1).

11           Os estudos envolvendo a identificação de patógenos de veiculação entérica de origem  
12 animal, em ambientes de recreação infantil e/ou do cotidiano humano, contemplam  
13 predominantemente patógenos isolados (2,3). O presente estudo revisou os principais  
14 patógenos veiculados pelas fezes de animais domésticos, que podem ser considerados  
15 indicadores de contaminação ambiental para ambientes de recreação humana, como parques e  
16 praças.

17

## 18 **REVISÃO DE LITERATURA**

19           A rodococose é uma doença infecto-contagiosa causada por *R. equi* relacionada a  
20 diversas manifestações clínicas em animais domésticos, selvagens e humanos. A doença se  
21 caracteriza por lesões piogranulomatosas, de difícil resolução terapêutica (4).

22           O equino é a principal espécie animal acometida pelo *R. equi*, especialmente os potros.  
23 Clinicamente a doença manifesta-se por infecções pulmonares e, em menor frequência, por  
24 distúrbios entéricos e/ou articulares. Nos suínos o comportamento não é progressivo,  
25 apresentando-se como linfadenite com lesões semelhantes às observadas na tuberculose (5).

1 Em outras espécies de animais ocorre sob a forma de enterite, linfadenite, abortamento,  
2 mastite, dermatite e piometra (6). Em animais de companhia as infecções por *R. equi* são mais  
3 frequentes em gatos do que em cães. A via transcutânea parece representar a principal forma  
4 de infecção para cães e gatos (7). *R. equi* é eliminado pelas fezes de herbívoros ou onívoros,  
5 incluindo eqüinos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervos. Raramente é isolado das fezes  
6 de humanos e de cães e ainda não foi isolado das fezes de gatos (6).

7         Recentemente a virulência das linhagens de *R. equi* foi atribuída à presença de  
8 plasmídios e antígenos denominados VAP (*virulence associated protein*), que impulsionaram  
9 os estudos quanto a epidemiologia e patogenicidade em linhagens isoladas de animais,  
10 humanos e do ambiente. As linhagens virulentas possuem antígenos de 15 a 17 kDa que  
11 codificam proteínas VapA e são encontradas em estirpes isoladas de pneumonia em potros e  
12 pacientes HIV-positivos. As estirpes de virulência intermediária (20 kDa - VapB) são  
13 identificadas na linfadenite em suínos, e predominantemente, em pacientes com Aids,  
14 enquanto as avirulentas (não detentoras dos plasmídios supracitados), ocorrem geralmente no  
15 ambiente de criação de herbívoros domésticos (solo, fezes), especialmente em criatórios de  
16 eqüinos e bovinos (5).

17         Takai et al. (8) investigaram a virulência de estirpes de nove cães e nove gatos com  
18 diferentes afecções por *R. equi*, dos quais um dos gatos procedente do Brasil. Foram  
19 identificadas estirpes virulentas em cinco gatos e em um cão, alertando para a maior  
20 prevalência de linhagens virulentas em gatos e a preocupação do convívio destes animais com  
21 pacientes HIV-positivos. No Brasil, Farias et al. (9) descreveram piogranulomatose cutânea  
22 em gato por *R. equi*, caracterizado como VapA, semelhante ao padrão encontrado em potros.

23         A rodococose em humanos é reconhecida como doença emergente (4). As infecções  
24 por *R. equi* são descritas em indivíduos imunossuprimidos, transplantados, portadores de  
25 neoplasias, submetidos à terapia prolongada com corticóide, e, em especial, pacientes

1 acometidos pela Aids (4). Verville et al. (10) nos EUA investigaram a epidemiologia de 12  
2 casos de rodococose humana, dos quais seis acometidos por Aids, e constataram que dois  
3 tinham histórico de contato com equinos e seu ambiente de criação, um com cão doméstico e  
4 outro com ambiente rural.

5 Sugere-se que a transmissão de *R. equi* dos animais para os humanos estaria  
6 relacionada à exposição ao agente no ambiente, secundária à inalação, lesões transcutâneas,  
7 (6), ou pelo contato com animais domésticos, ou seu ambiente de criação. Prescott (6) referiu  
8 que 12 dentre 32 pacientes acometidos de rodococose tinham histórico de contato com  
9 animais e/ou ambientes de criação de espécies domésticas.

10 Clinicamente, a rodococose nos humanos manifesta-se por pneumonia cavitária  
11 crônica com derrame pleural, acompanhada de febre, tosse e dores no peito. Secundariamente  
12 são observados quadros extrapulmonares como: abscessos renais, diarreia com sangue,  
13 caquexia, pleurisia, hepatopatias, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e  
14 meningite (11).

15 *R. equi* multiplica-se ativamente no ambiente, tendo como exigência condições  
16 mínimas de temperatura, pH e umidade, obtidas principalmente no material fecal de animais.  
17 Multiplica-se em extremos de temperatura (15°C a 37°C), mas preferencialmente em  
18 ambientes quentes, o que explicaria a elevada ocorrência do microrganismo em países de  
19 clima tropical. Em contraste, o microrganismo não se multiplica abaixo de 10°C (6).

20 Takai et al. (2) isolaram *R. equi* em 73,9% amostras de areia e terra de 115 parques e  
21 49 jardins no Japão. Nenhum dos isolados apresentou antígenos de 15-17 kDa e um  
22 apresentou apresentou antígeno 20 kDa. Os autores alertaram para extrema contaminação do  
23 ambiente de parques e praças no Japão pela bactéria e destacaram a necessidade de estudos  
24 com intuito de avaliar o risco de contaminação destes ambientes na transmissão da

1 rodococose. Na Hungria, a virulência de 48 estirpes isoladas do solo de dois criatórios de  
2 eqüinos revelou 26 (54,2%) linhagens virulentas VapA (85 kb tipo I) (12).

3 São pontuais os estudos no Brasil investigando a virulência plasmidial de estirpes de  
4 *R. equi* isoladas dos animais e humanos. Ribeiro et al. (13) revelaram elevada virulência de  
5 linhagens isoladas de potros, no estado de São Paulo, enquanto Farias et al. (9), relataram a  
6 virulência de *R. equi* em gato com infecção cutânea. Não existe, até o momento, nenhum  
7 estudo no país que tenha investigado a virulência de estirpes isoladas do ambiente, que  
8 permitisse a comparação entre a virulência de estirpes humanas e de animais. O  
9 reconhecimento dos antígenos de virulência do microrganismo e a sua utilização como  
10 marcadores de patogenicidade permitiram avanços significativos na identificação do perfil de  
11 virulência e de novas variantes da bactéria, e são imprescindíveis no esclarecimento da  
12 epidemiologia, patogenia, controle e reflexos em saúde pública da doença (14).

13 *E. coli* certamente é o principal representante das bactérias da família  
14 *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se sob a forma de cocobacilos Gram-negativos, encontrados  
15 na microbiota entérica de animais e humanos (15). Determinadas linhagens são patogênicas  
16 para humanos e animais. Nos animais, acarreta classicamente quadros gastroentéricos e  
17 grande variedade de outras afecções, incluindo mastite, diarreia, endometrite, cistite, nefrite,  
18 artrite, abortamento, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite, septicemia, entre  
19 outros (16). Nos humanos determina principalmente distúrbios gastrintestinais graves,  
20 infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias (17).

1 O microrganismo pode ser isolado quase que invariavelmente do material fecal de  
2 animais com e sem diarreia. A severidade clínica das colibaciloses depende da presença de  
3 fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade da linhagem. Certos fatores  
4 de virulência são componentes intrínsecos da estrutura bacteriana, também denominados  
5 endotoxinas (18). Outros se constituem de diferentes tipos de exotoxinas (enterotoxinas,  
6 verotoxinas, hemolisinas e fator necrosante citotóxico), ou propriedades que permitem a  
7 multiplicação em meios com baixa disponibilidade de ferro ou a multirresistência aos  
8 antimicrobianos (15).

9 As estirpes patogênicas podem causar diversos tipos de infecções e compreendem pelo  
10 menos seis patótipos associados às infecções intestinais (DEC – “Diarrhegenic *Escherichia*  
11 *coli*”) e vários outros associados com infecções extra-intestinais (ExPEC – “Extraintestinal  
12 Pathogenic *Escherichia coli*”). As diferentes linhagens de *E. coli* responsáveis  
13 predominantemente por distúrbios entéricos são agrupadas em seis tipos: enterotoxigênicas  
14 (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC),  
15 enteroagregativas (EAEC) e de aderência difusa (DAEC) (15).

16 EPEC predomina como causa de diarreia em crianças com menos de um ano,  
17 sobretudo em países emergentes. Clinicamente se manifesta por diarreia aquosa contendo  
18 muco, febre e desidratação. Linhagens EPEC determinam lesão histopatológica intestinal  
19 conhecida por “*attaching and effacing*” (A/E). A bactéria se adere intimamente às células  
20 epiteliais intestinais e acarreta mudança no citoesqueleto celular. As microvilosidades  
21 intestinais formam estruturas parecidas com “pedestais”, a qual a bactéria se adere na mucosa.  
22 A habilidade de induzir o A/E é codificada pelo gene *eae* que codifica a proteína chamada  
23 intimina, que é responsável pela junção íntima de EPEC às células epiteliais (19).

24 As ETEC causam diarreia aquosa, leve a severa. São responsáveis por  
25 aproximadamente 20% dos casos de diarreia em crianças com menos de cinco anos, bem

1 como é o principal agente da “diarréia dos viajantes”. Esta classe produz fímbrias de  
2 colonização e dois tipos principais de enterotoxinas denominadas toxinas termolábeis (LT) e  
3 termoestáveis (ST). As LTs são enterotoxinas parecidas com a toxina colérica que alteram a  
4 atividade da adenilciclase ativando canais de cloro, levando à saída de água e à diarréia. LT é  
5 encontrada predominantemente em isolados humanos (20). As STs são divididas em STa e  
6 STb. A toxina STa é associada a doença em humanos, enquanto que a STb é associada a  
7 doença em animais (21).

8 EIEC produz toxina semelhante à produzida por *Shigella* sp. Após penetrar nas células  
9 epiteliais do cólon, se multiplica e invade as células adjacentes causando inflamação e sinais  
10 de diarréia aquosa, com muco e sangue, febre, mal estar e cólica. A infecção por EIEC é mais  
11 freqüente em crianças com mais de dois anos de idade e em adultos (22).

12 *E. coli* enteroagregativas se caracterizam por padrão de adesão às células epiteliais.  
13 EAEC é considerado patógeno emergente e tem sido associado à diarréia aguda ou  
14 persistente, em casos esporádicos ou em surtos, em crianças e adultos em vários países. A  
15 colonização ocorre predominantemente no cólon, seguida por secreção de enterotoxinas e  
16 citotoxinas. Linhagens de EAEC foram isoladas de animais, porém ainda não foi estabelecido  
17 o papel destes como reservatórios para humanos (20).

18 Linhagens DAEC são caracterizadas por padrão agregativo celular. Causam diarréia  
19 em crianças com mais de um ano de idade. Determinam o alongamento das microvilosidades  
20 ao redor da célula bacteriana, reduzindo a borda em escova da mucosa intestinal (23). Na  
21 última década, *E. coli* EHEC sorotipo O157:H7 foi reconhecida como causa emergente de  
22 doença entérica e insuficiência renal (síndrome urêmica) em humanos. Esta classe possui  
23 citotoxinas (24), plasmídios e fatores de colonização (25). O sorotipo O157:H7 inibe a síntese  
24 protéica, produz efeito citopático “in vitro” em células Vero, denominadas de verotoxinas-  
25 VTs ou *Shiga-like* toxinas (STX) e altera fatores de coagulação sanguínea. Também causa

1 lesão A/E (“attaching and effacing”) e colonizam preferencialmente o cólon (22). A infecção  
2 pelo sorotipo O157:H7 culmina em grave quadro de colite hemorrágica, trombocitopenia e  
3 síndrome urêmica hemolítica, freqüentemente fatal em crianças e indivíduos debilitados. A  
4 espécie bovina é caracterizada como a principal fonte de infecção do sorotipo O157:H7,  
5 eliminado pelas fezes de bovinos com e sem sintomas entéricos (26). Em crianças com menos  
6 de dez anos, a doença é altamente letal. As infecções humanas estão relacionadas ao consumo  
7 de carne crua ou sem cocção adequada – principalmente de origem bovina – ou ingestão de  
8 água, leite e derivados, e diversas variedades de frutas e verduras contaminadas pelas fezes  
9 (27). Cães (28) e gatos (29) também já foram descritos acometidos por *E. coli* O157:H7  
10 verotoxigênicas, denotando o risco dos animais de companhia na transmissão deste sorotipo.

11 No Brasil, Cerqueira et al. (30) notificaram pela primeira vez o sorotipo nas fezes de  
12 bovinos em abatedouros no Rio de Janeiro. Estudos subseqüentes investigaram o sorotipo  
13 O157:H7 em leite bovino (13), e em casos de infecção entérica e renal em crianças (31).

14 As infecções extra-intestinais (IEs) por *E. coli* ocorrem em todos os grupos etários e  
15 podem acometer diversos órgãos. Como IEs típicas merecem destaque as ITUs por *E. coli*  
16 uropatogênicas (UPEC), meningite/septicêmica (MNEC) especialmente em neonatos,  
17 infecções intra-abdominais, pneumonia, osteomielite e infecções em tecidos moles (32).

18 A salmonelose é considerada uma das principais zoonoses em todo o mundo. O  
19 microrganismo é ubíquo e acarreta diversas afecções em humanos e animais. A classificação é  
20 motivo de controvérsia entre os bacteriologistas em virtude da co-existência de subdivisão  
21 sorológica e, recentemente, molecular. Aceita-se atualmente a existência de duas espécies, *S.*  
22 *enterica* (patogênica) e *S. bongori* (saprófita). *S. enterica* é a espécie de maior importância  
23 contendo vários sorotipos patogênicos para os animais e humanos (1).

24 Em humanos, o microrganismo está intimamente relacionado às toxinfecções  
25 alimentares decorrentes especialmente do consumo de produtos de origem animal. A principal

1 forma de transmissão do agente para os humanos ocorre pela via fecal-oral por contaminação  
2 de água e utensílios, levando a gastroenterite severa, ocasionalmente fatal. As manifestações  
3 clínicas da doença incluem febre, forte dor abdominal, episódios de vômito e diarreia com  
4 estrias de sangue, mialgias e sinais de desidratação (1).

5 Diferentes espécies de animais e inclusive humanos podem albergar a bactéria no  
6 intestino, com eliminação intermitente pelas fezes. Podem eliminar o agente pelas fezes, com  
7 e sem sinais entéricos, e se infectar por diferentes sorotipos. O estreito contato entre as  
8 crianças e os animais de companhia somados aos hábitos precários de higiene em crianças  
9 contribui para o risco de infecções pela bactéria (33).

10 Diferentes enteropatógenos têm sido apontados como emergentes em humanos, entre  
11 eles *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. No Brasil, Ribeiro et al. (34) descreveram caso  
12 de gastroenterite, septicemia e falha renal pelo sorotipo Enteritidis em cão domiciliado.

13 Doorduyn et al. (35), nos países baixos, aplicaram inquérito epidemiológico à  
14 pacientes que apresentaram gastroenterite por *Salmonella* sp visando investigar os fatores de  
15 risco relacionados à transmissão. Dentre 1194 casos, 37% foram causados por *S. Enteritidis* e  
16 37% por *S. Typhimurium*. Ambos sorotipos tiveram maior ocorrência em crianças com idade  
17 entre 0-4 anos e *S. Typhimurium* apresentou maior ocorrência em áreas rurais. Os principais  
18 fatores de risco associados a infecções por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram o consumo  
19 de alimentos crus de origem animal e o contato de crianças de 4-12 anos com caixas de areia.

20 A toxoplasmose é a zoonose parasitária cosmopolita mais comum que acomete  
21 humanos e animais homeotérmicos. O coccídeo, *T. gondii*, pertence à família Sarcocystidae e  
22 é um protozoário intracelular obrigatório (1).

23 *T. gondii* é a única espécie reconhecida do gênero, embora sejam descritas variantes  
24 genotípicas na ocorrência da doença em animais e no homem. O protozoário possui três  
25 estágios principais de desenvolvimento. O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase

1 aguda da infecção e possui multiplicação rápida no interior das células, incluindo células do  
2 sistema fagocítico mononuclear, hepáticas, pulmonares, nervosas, da submucosa e  
3 musculares. Os bradizoítos se constituem na forma de multiplicação lenta, encontrados no  
4 interior de cistos localizados predominantemente no SNC, globo ocular, musculatura  
5 esquelética e cardíaca. O oocisto contendo esporozoítos é a forma eliminada pelas fezes do  
6 hospedeiro definitivo, representado pelos felídeos, em especial, o gato doméstico. O oocisto  
7 possui uma parede externa dupla que confere alta resistência do parasita às condições  
8 ambientais (36).

9 Os felídeos são os únicos animais onde se completa a fase sexuada do parasita, a qual  
10 leva à excreção de oocistos nas fezes. Os felídeos se infectam após ingestão de hospedeiros  
11 intermediários infectados com *T. gondii* ou oocistos do ambiente. A eliminação de oocistos  
12 nas fezes ocorre durante 7 a 15 dias pós-infecção. Em torno de 2 a 5 dias esporulam e tornam-  
13 se infectantes em condições favoráveis de pH, temperatura e umidade, podendo permanecer  
14 viáveis na água e solo durante meses (7).

15 Os animais e humanos podem se infectar pelas três formas do ciclo de vida de *T.*  
16 *gondii*: ingestão de oocistos esporulados (frutas, verduras e legumes crus), de cistos teciduais  
17 presentes em carne contaminada e mal cozida, além de taquizoítos que podem estar presentes  
18 em leite não pausteurizado (37). Além disso, em humanos a infecção por taquizoítos pode  
19 ocorrer por via transplacentária e, ocasionalmente, em transplantes de órgãos e transfusões  
20 sanguíneas (38).

21 Estudos em diversos países referem grandes variações na soroprevalência da infecção.  
22 Países latino-americanos (Brasil, Venezuela, Cuba e Jamaica) apresentaram elevada  
23 ocorrência em mulheres, variando de 51 a 72% (39).

24 A toxoplasmose congênita apresenta altas taxas de morbimortalidade. No Brasil  
25 estima-se que anualmente cerca de 60.000 crianças sejam acometidas pela doença. O risco

1 médio de transmissão transplacentária é de 30%. A gravidade para o feto é inversamente  
2 proporcional à idade gestacional. As principais manifestações neurológicas pós-natais são  
3 microcefalia, hidrocefalia, calcificações intracerebrais, coriorretinite e retardo mental (40).

4 Os gatos são fundamentais para a manutenção do ciclo biológico da toxoplasmose. A  
5 contaminação por fezes de gatos em areia/solo de parques, praças e ambientes recreacionais  
6 assume risco importante na transmissão da toxoplasmose, especialmente para crianças,  
7 pacientes com algum grau de imunossupressão, e mulheres gestantes (41). Meireles et al. (42)  
8 compararam a soroprevalência entre cães e gatos semidomiciliados pelo método de ELISA,  
9 nos quais encontraram anticorpos em 40% dos gatos e 50,5% dos cães, mostrando o impacto  
10 da infecção pelo parasito no Estado de São Paulo. Entretanto, pouca atenção tem sido dada a  
11 contaminação do ambiente dos humanos na veiculação do parasita.

12 Larva migrans visceral/ocular é reconhecida como importante zoonose causada por migração  
13 errática de estágios larvais de parasitas intestinais de cães e gatos do gênero *Toxocara* em  
14 animais de companhia. Em cães e gatos as espécies mais prevalentes da doença são causadas  
15 por *T. canis* e *T. cati*, respectivamente. A prevalência do parasita na população canina pode  
16 chegar até 81%. Crianças na faixa etária de um a cinco anos infectam-se ao ingerirem ovos  
17 embrionados de *Toxocara* sp., pelo hábito de geofagia. Ao eclodir, as larvas atravessam a  
18 parede do intestino delgado e iniciam migração pela via linfática ou circulação portal para  
19 diversos órgãos, principalmente fígado e pulmões, podendo atingir coração, globo ocular e  
20 sistema nervoso central (43).

21 As infecções mais graves são aquelas que acometem o globo ocular e sistema nervoso  
22 central. A forma larval ocular (Larva Migrans Ocular) pode resultar em quadro de  
23 conjuntivite, endoftalmite, estrabismo, leucocoria, granuloma periférico da retina e perda da  
24 visão (44). As manifestações clínicas da larva migrans visceral são astenia crônica,  
25 convulsões, pneumonia, arterite, nefrite, miocardite, meningoencefalite (45).

1 Epidemiologicamente, é importante ressaltar que o livre acesso de cães e gatos a locais  
2 de recreação, propiciam a contaminação do solo. Estima-se que fêmeas de *Toxocara* possam  
3 eliminar até 200.000 ovos por dia. Devido à consistência da cutícula externa, os ovos de  
4 *Toxocara* permanecem viáveis por vários meses no ambiente, expondo continuamente a  
5 população humana ao risco de infecção e desenvolvimento da doença (3).

6 Espinoza et al. (46) estudaram a soroprevalência da doença em Lima, Peru, em  
7 pacientes com sinais oculares suspeitos e obtiveram 55,6% de positividade. Talvik et al. (47)  
8 analisaram 454 amostras de fezes e areia de parques em Tartu, Estônia e observaram 17, 8%  
9 de amostras de areia positivas para ovos de *Toxocara* sp. Além disso, foi realizada necropsia  
10 em 41 cães e 27 gatos eutanasiados que apresentaram 14,6% de *T. canis* e 48,2% de *T. cati*  
11 (presença de parasitos adultos), respectivamente. Os autores alertaram que crianças são o  
12 maior grupo de risco para contaminação ambiental por *Toxocara* sp. e que gatos são tão  
13 importantes disseminadores do parasita quanto cães.

14 No Brasil, Costa-Cruz et al. (48) estudaram a frequência de contaminação de praças  
15 públicas de Uberlândia, MG, por ovos de *Toxocara* sp. em amostras de areia e encontraram o  
16 parasita em 23% da amostragem. Santarém et al. (3) também encontraram ovos de *Toxocara*  
17 sp. em 60% de amostras de praças públicas de Botucatu, SP. Coelho et al. (43), em Sorocaba,  
18 pesquisaram a presença de ovos de *Toxocara* sp. em trinta praças, tendo recuperado o parasita  
19 em dezesseis (53,3%).

20

## 21 CONCLUSÃO

22 *R. equi* são bactérias de comportamento oportunista, relacionadas a graves infecções  
23 piogranulomatosas nos animais e no homem. Recentemente, a patogenicidade do organismo  
24 foi relacionada à presença de marcadores de virulência de origem plasmidial. As estirpes  
25 virulentas (VapA) tem sido identificadas em potros e em pacientes humanos com Aids. As

1 estirpes de virulência intermediária são identificadas principalmente na linfadenite em suínos  
2 e humanos com Aids. As linhagens avirulentas são identificadas no ambiente de criatórios de  
3 animais domésticos, em solos/areia de parques de recreação de humanos e também em  
4 humanos HIV-positivos. Não está completamente esclarecido o papel do ambiente e dos  
5 animais na transmissão da rodococose para os humanos, visto que se tem identificado  
6 linhagens virulentas e avirulentas do ambiente. Em dias atuais, a detecção de marcadores de  
7 virulência de *R. equi* é imprescindível para a investigação da epidemiologia da doença em  
8 humanos e em animais, assim como para avaliar os reflexos em saúde pública da rodococose.  
9 No Brasil são raros os estudos direcionados à caracterização de virulência em linhagens de *R.*  
10 *equi* isoladas de humanos e animais.

11 Estirpes patogênicas de *E. coli* causam diferentes tipos de afecções associadas às  
12 infecções intestinais e várias outras associadas com infecções extra-intestinais. As  
13 manifestações clínicas das colibaciloses estão associadas a diferentes fatores de virulência  
14 constituídos por endotoxinas (LPS), cito ou exotoxinas (hemolisinas, CNF, VTs,  
15 enterotoxinas), sideróforos, multirresistência aos antimicrobianos, ou a colonização celular  
16 (pili, adesinas ou fímbrias). Linhagens da classe enterohemorrágica - sorotipo O157:H7 - são  
17 relacionadas nos humanos às graves manifestações clínicas de colite hemorrágica e falha renal  
18 aguda, de curso fatal em crianças e pacientes debilitados. Os quadros clínicos estão  
19 intimamente relacionados ao consumo de carne e subprodutos de origem bovina – com cocção  
20 inadequada -, leite e derivados, verduras, frutas e água contaminadas com as fezes de animais.

21 O gênero *Salmonella* é incriminado como agente causal de severos surtos de  
22 toxinfecções de origem alimentar nos humanos. O microrganismo possui vários sorotipos que  
23 são comuns aos animais e humanos. Determinados sorotipos de *Salmonella* sp isolados de  
24 animais são reconhecidos atualmente como emergentes de doença em humanos, incluindo o  
25 sorotipo Enteritidis. À semelhança de *E. coli*, ambientes de visitação humana como praças e

1 parques representam riscos na transmissão da bactéria, particularmente para crianças e  
2 adolescentes.

3 A toxoplasmose provoca severos agravos aos humanos, incluindo abortamentos,  
4 distúrbios oculares e seqüelas neurológicas, irreversíveis nos fetos de mulheres em certas  
5 fases gestacionais. O livre acesso de gatos em ambientes de recreação infantil representa risco  
6 potencial na transmissão da toxoplasmose para humanos. Larva migrans visceral é  
7 reconhecida como importante zoonose causada por migração errática de estágios larvais de  
8 parasitas intestinais do gênero *Toxocara*, em animais de companhia. Em cães e gatos as  
9 espécies mais prevalentes da doença são *T. canis* e *T. cati*, respectivamente.  
10 Epidemiologicamente é importante ressaltar que o livre acesso de cães e gatos a locais de  
11 recreação, propiciam a contaminação do solo.

12 Os estudos envolvendo a identificação de patógenos de veiculação entérica de origem  
13 animal, em ambientes de recreação infantil e/ou do cotidiano humano, contemplam  
14 predominantemente patógenos isolados. Não se tem notado na literatura especializada  
15 esforços no intuito de avaliar, simultaneamente, os principais patógenos de veiculação fecal  
16 de animais domésticos em ambientes do cotidiano humano, tampouco investigar marcadores  
17 de virulência nestes microrganismos, que possam sinalizar o impacto da patogenicidade dos  
18 isolados. Ademais, pouca ênfase é observada em recomendar ações práticas e factíveis que  
19 possam, no mínimo, reduzir a contaminação dos ambientes.

20

## 21 REFERÊNCIAS

22

23 1. ACHA PN, SZYFRES B. Zoonosis y enfermedad transmissibles communes al hombre y a  
24 los animais. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica e Técnica. 3 ed.  
25 Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 413p.

26

27 2. TAKAI S, FUKUNAGA N, OCHIAI S, SAKAI T, SASAKI Y, TSUBAKI S. Isolation of  
28 virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards  
29 in Japan. J Vet Med Sci. 1996;58:669-72.

30

- 1 3. SANTARÉM VA, SARTOR IF, BERGAMO FMM. Contaminação por ovos de *Toxocara*  
2 spp. em parques e praças públicas de Botucatu, SP, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop.  
3 1998;31:529-532.  
4
- 5 4. LINDER R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: Two “Coryneform”  
6 bacteria increasingly recognized as agents of human infection. Emerg Infect Dis. 1997;3:1-10.  
7
- 8 5. TAKAI S, TAKEDA K, NAKANO Y, KARASAWA T, FURUGOORI J, SASAKI Y et al.  
9 Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in a infected foal. J Clin Microbiol.  
10 1997;35:1904-8.  
11
- 12 6. PRESCOTT J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin Microbiol Rev.  
13 1991;4:20-34.  
14
- 15 7. GREENE CE. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: Saunders Company,  
16 2006.  
17
- 18 8. TAKAI S, MARTENS RJ, JULIAN A, RIBEIRO MG, FARIAS MR, SASAKI Y et al.  
19 Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. J Clin Microbiol. 2003;41:4468-  
20 70.  
21
- 22 9. FARIAS MR, TAKAI S, RIBEIRO MG, FABRIS VE, FRANCO SRVS. Cutaneous  
23 pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87-kb type I  
24 plasmid. Aust Vet J. 2007; 85:29-31.  
25
- 26 10. VERVILLE TD, HUYCKE MM, GREENFIELD RA, FINE DP, KUHL TL, SLATER  
27 LN. *Rhodococcus equi* infections in humans. Medicine. 1994;73:119-132.  
28
- 29 11. SEVERO LC, LONDERO AT. Rodococoses. In: VERONESI R, FOCACCIA R. Trat  
30 Infectol. São Paulo: Atheneu, 1996. p.1032-3.
- 31 12. MAKRAI L, TAKAI S, TAMURA M, TSUKAMOTO A, SEKIMOTO R, SASAKI Y et  
32 al. Characterization of virulence plasmids in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs,  
33 humans and soil in Hungary. Vet Microbiol. 2002;88:377-384.  
34
- 35 13. RIBEIRO MG, COSTA EO, LEITE DS, LANGONI H, GARINO JÚNIOR F,  
36 VICTORIA C et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de  
37 mastite bovina. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006;58:724-731.  
38
- 39 14. RIBEIRO MG, SALERNO T, LARA GHB, SIQUEIRA AK, FERNANDES MC. Fatores  
40 de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose  
41 nos animais e no homem. Vet Zootec. 2007;14:1-8.  
42
- 43 15. CAMPOS LC, TRABULSI LR. *Escherichia*. In: TRABULSI LR, ALTERTHUM F,  
44 GOMPertz OF, CANDEIAS JAN. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 1999.  
45
- 46 16. RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW, CONSTABLE PD. Diseases associated  
47 with *Escherichia coli*. In: RADOSTITS OM, GAY CC, BLOOD DC, HINCHCLIFF KW.  
48 Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.  
49 London: W. B. Saunders, 2007. p.847-848.  
50

- 1 17. FRANCO BDGM, LANDGRAF M. Microrganismos patogênicos de importância em  
2 alimentos. In: FRANCO BDGM, LANDGRAF M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo:  
3 Atheneu, 1996. p.33-81.  
4
- 5 18. CASTRO AFP, YANO T. Principais doenças entéricas dos bezerros de origem bacteriana.  
6 In: CHARLES TP, FURLONG J. Diarréia dos bezerros. Coronel Pacheco: EMBRAPA-  
7 CNPGL, 1992. p. 1-38.  
8
- 9 19. MCDANIEL TK, JARVIS KG, DONNENBERG MS, KAPER JB. A genetic locus of  
10 enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad  
11 Sci USA. 1995; 92:1664-8.  
12
- 13 20. TRABULSI LR, ALTERTHUM F. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.  
14
- 15 21. SEARS CL, KAPER JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to  
16 intestinal secretion. Microbiol Rev. 1996;60:167-215.  
17
- 18 22. VERONESI R, FOCACCIA R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 1996.  
19 2167p.  
20
- 21 23. SCALETSKY IC, FABBRICOTTI SH, SILVA SO, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO  
22 U. Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo,  
23 Brazil. Emerg Infect Dis. 2002;8:855-8.  
24
- 25 24. GRIFFIN PM, TAUXE RV. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia coli*  
26 O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome.  
27 Epidemiol Rev. 1991;13:60-8.  
28
- 29 25. JUNKINS AD, DOYLE MP. Comparison of adherence properties of *Escherichia coli*  
30 O157:H7 and a 60-megadaltonplasmid-cured derivate. **Cur Microbiol.** 1989;19:21-7.  
31
- 32 26. FAITH NG, SHEER JA, BROSH R. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli*  
33 O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. Appl Environ Microbiol, 1996;62:1519-25.  
34
- 35 27. TARR PI. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of  
36 human infection. Clin Infect Dis. 1995;20:1-10.  
37
- 38 28. VON SYDON ACM, DEL G. Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em  
39 estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes [dissertação]. São Paulo: Faculdade de  
40 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.  
41
- 42 29. BUSCH U, HORMANSDORFER S, SCHRANNER S, HUBER I, BOGNER KH, SING  
43 A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* coll excretion by child and her cat. Emerg Infect Dis,  
44 2007;13:348-9.  
45
- 46 30. CERQUEIRA AMF, GUTH BEC, JOAQUIM RM, ANDRADE JRC. High occurrence of  
47 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State,  
48 Brazil. Vet Microbiol. 1999;70:111-21.  
49

- 1 31. DE SOUZA RL, NISHIMURA LS, GUTH BE. Uncommon Shiga toxin-producing  
2 *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo,  
3 Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59:223-5.  
4
- 5 32. KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev.*  
6 2004;2:123-140.  
7
- 8 33. TREVEJO RT, COURTNEY JG, STARR M, VUGIA DJ. Epidemiology of Salmonellosis  
9 in California, 1990-1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am J Epidemiol.*  
10 2003;157:48-57.  
11
- 12 34. RIBEIRO M G, BRITO CJC, PAES AC, MEGID J, PINTO JPAN, LISTONI FJP.  
13 Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. *Relato de caso.*  
14 *Clin Vet.* 2003;8:30-7.  
15
- 16 35. DOORDUYN Y, VAN DEN BRANDHOF WE, VAN DUYNHOVEN YT, WANNET  
17 WJ, VAN PELT W. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium (DT104 e não  
18 DT104) infections in the Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and  
19 sandboxes in Typhimurium infections. *Epidemiol Infect.* 2006;134:617-26.  
20
- 21 36. DUBEY JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;205:1593-8.  
22 37. TENTER AM. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*.  
23 *Tok J Exp Clin Med.* 1999;23:391.  
24
- 25 38. SUBAUSTE CS, REMINGTON JS. Toxoplasmose. In: BENNETT JC, PLUM F. *Tratado*  
26 *de Medicina Interna.* Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan 2, 1997. p.2106 – 9.  
27
- 28 39. KAWAZOE U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES DP. *Parasitologia humana.* São Paulo:  
29 Atheneu, 2005. p.163-172.  
30
- 31 40. MACEDO VO. Toxoplasmose. In: CASTRO LP, CUNHA AS, RESENDE JM.  
32 *Protozooses Humanas.* Fundação BYK, 1994. p.153-170.  
33
- 34 41. FRENKEL JK. Toxoplasmose. In: VERONESI R, FOCACCIA R. (Eds). *Tratado de*  
35 *Infectologia.* Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p.1290 – 1305.  
36
- 37 42. MEIRELES LR, GALISTEO AJ Jr, POMPEU E, ANDRADE HF Jr. *Toxoplasma gondii*  
38 spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and  
39 dogs. *Trop Med Int Health.* 2004;9:876-81.  
40
- 41 43. COELHO LMPS, DINI CY, MILMAN MHSA, OLIVEIRA SM. *Toxocara* spp eggs in  
42 public squares of Sorocaba, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2001;43:189-91.  
43
- 44 44. OVERGAAUW PA. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. *Rev*  
45 *Microbiol.* 1997;23:215-231.  
46
- 47 45. ROBINSON A, TANNIER C, MAGNAVAL JF. *Toxocara canis* menigoradiculitis. *Rev*  
48 *Neurol.* 2002;158:351-3.  
49

- 1 46. ESPINOZA YRMA, HUAPAYA P, AYLLÓN C, SEVILLA C, HUIZA A, JIMÉNEZ S.  
2 Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. In: Anales de la Facultad de Medicina,  
3 2003, San Marcos. San Marcos: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2003. p. 247-  
4 51.
- 5  
6 47. TALVIK H, MOKS E, MAGI E, JARVIS T, MILLER I. Distribution of *Toxocara*  
7 infection in the environment and in definitive and paratenic hosts in Estonia. Act Vet Hung.  
8 2006;54:399-406.
- 9  
10 48. COSTA-CRUZ JM, NUNES RS, BUSO AG. Presence of *Toxocara spp* eggs in public  
11 squares of Uberlandian city, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop, 1994;36:39-42.