

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

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PEIXES E ÁGUA DE
PESQUE-PAGUES.**

Mayhara Martins Cordeiro Barbosa
Tecnóloga em Gestão Ambiental

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

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

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PEIXES E ÁGUA DE
PESQUE-PAGUES.**

Mayhara Martins Cordeiro Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

Barbosa, Mayhara Martins Cordeiro
B238i Identificação sorológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de peixe e água de pesque-pagues / Mayhara Martins Cordeiro Barbosa. -- Jaboticabal, 2010
xiii, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadores: Fernando Antonio de Ávila, Luiz Augusto do Amaral
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Luiz Florencio Franco Margatho
Bibliografia

1. Sorogrupo. 2. EPEC. 3. Resistência. 4. Pesque-pague. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

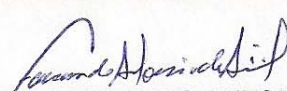
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

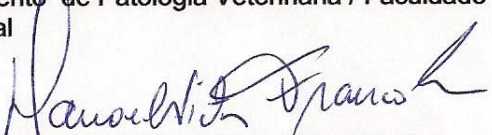
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

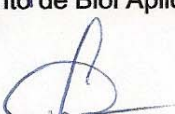
TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PEIXES E ÁGUA DE PESQUE-PAGUES.

AUTORA: MAYHARA MARTINS CORDEIRO BARBOSA
ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

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


Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biol Aplicada A Agrop / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUIZ FLORENCIO FRANCO MARGATHO
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios / Bauru/SP

Data da realização: 25 de fevereiro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAYHARA MARTINS CORDEIRO BARBOSA – nascida em 01 de março de 1986, na cidade de Fortaleza – CE, é formada pelo curso de Tecnologia em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação Tecnológica do Ceará – IFCE, em dezembro de 2007. Durante os quatros anos da graduação participou de diversos projetos junto ao Laboratório de Águas de Mananciais e Residuárias (LIAMAR) do IFCE, recebendo bolsa da instituição de ensino. Em março de 2008 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na FCAV, UNESP, sendo aprovada no exame geral de qualificação no dia 18 de dezembro de 2009 e bolsista do CNPq a partir de março de 2009.

Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar, e conheça todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tenha tamanha fé, a ponto de transportar os montes, se não tiver amor, nada serei.

E ainda que distribua todos os meus bens entre os pobres, e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará.

O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece,

não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal.

não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade;
tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais acaba; mas havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará,

porque, em parte conhecemos e, em parte profetizamos;

Quando, porém, vier o que é perfeito, então o que é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino; sentia como menino, pensava como menino; quando cheguei a ser homem, desisti das coisas próprias de menino.

Porque, agora, vemos como em espelho, obscuramente, então veremos face a face.

Agora, conheço em parte, então conhecerei também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor.

(I Coríntios 13:1,2)

Aos meus pais (*in memoriam*), pois sei que o amor que me foi dado sempre me protege e me guia pela vida. Obrigada PAI por me ensinar o real valor da vida!!!

À Gal, mãe dedicada e ser humano inigualável.

Aos meus irmãos Valtinho e Jonathan, meus maiores estímulos.

À tia Ivone, minha incentivadora e conselheira.

Ao prof. Amaral, grande responsável pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Ofereço e dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me abandonar e por sempre me conduzir.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos. Obrigada pela paciência, dedicação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, pela preciosa orientação e por me aceitar, com total disponibilidade, acreditando e confiando em mim.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. Antônio Carlos Monteiro, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Prof. Dr. Luiz Florêncio Franco Margatho, pela valiosa colaboração.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ferraud pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Cíntia Lorenzon, grande colaboradora deste trabalho, pelas coletas das amostras de campo e pelas análises microbiológicas.

À amiga Helen por sempre estar ao meu lado e pela amizade incondicional e ao Prof. Dr. José Renato Zanini pelo apoio em todos os momentos.

À Fernanda e Laryssa, grandes companheiras de trabalho e amigas inestimáveis, pela imensa colaboração nas análises e nos demais momentos divididos.

Aos técnicos Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Jr. (Diba), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela ajuda nas análises e suporte dado.

Aos docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos e, principalmente a Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos pela compreensão e exemplar coordenação do curso.

À Edna, secretária do Programa de Microbiologia Agropecuária, pela atenção e por sempre se mostrar disposta em ajudar.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, pela ajuda e esclarecimentos fornecidos.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

Às colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Viviane, Bel, Bruna, Cíntia, Suzana, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

À minha família, vó, tios e tias, primos e primas, em especial à tia Ivone, por sempre estar ao meu lado me incentivando e me dando todo suporte necessário para meu crescimento.

Aos primos Marcelo e Michelly por ser minha família em Jaboticabal e por todo apoio e amizade.

À tia Clevandi e ao tio Martins, pela ajuda financeira como também por acreditarem em mim.

Aos meus eternos mestres, Mabel Calina de França Paz, Rosana Maria Costa Fernandes e Raimundo Bemvindo Gomes. Muito obrigada pelos ensinamentos passados e pelo apoio em momentos difíceis.

À minha grande amiga Suelen, mesmo à distância você foi uma pessoa fundamental nesta etapa da minha vida. Nêga, amo muito você!

À minha amiga Ana Cleuma e meu afilhado João Victor, por encher minha vida de alegrias e pela compreensão em relação à distância.

Ao Leandro, pela dedicação e compreensão e por sempre estar disposto a me ouvir e dividir todos os momentos tristes e felizes.

Às Irmãs Carmelitas, família grandiosa e cheia de amor, pelas orações e carinho em todos os momentos.

Agradeço muito a todos que de alguma forma me ajudaram nesta jornada, pois diante da grandeza e do amor do ser humano, as dificuldades encontradas tornaram-se insignificantes e foi, principalmente, por aqueles que amo que tive forças para chegar ao fim. Que Deus abençoe a todos sempre.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aquicultura e o consumo de pescado.....	3
2.2 Pesque-pagues.....	4
2.3 Poluição das águas e sua influência na qualidade do pescado.....	5
2.4 Uso de antimicrobianos na aquicultura	6
2.5 Peixe como origem de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs).....	7
2.6 <i>Escherichia coli</i>	9
2.7 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC).....	10
2.8 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	12
2.9 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	13
2.10 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	14
2.11 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	15
2.12 <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC).....	16
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Local, colheita e transporte das amostras de água e peixe.....	18

4.2	Preparo das amostras e isolamento de <i>Escherichia coli</i>	19
4.2.1	Água de enxaguadura da pele.....	19
4.2.2	Tecido muscular	19
4.2.3	Trato gastrintestinal.....	19
4.3	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	20
4.4	Identificação bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	20
4.4.1	Indol.....	20
4.4.2	Prova vermelho de metila.....	21
4.4.3	Prova Voges-Proskauer.....	21
4.4.4	Utilização de citrato.....	21
4.5	Atividade Hemolítica.....	22
4.6	Detecção dos sorogrupos de <i>E. coli</i> por aglutinação em lâmina.....	22
4.7	Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA).....	22
4.7.1	Antibiograma.....	22
4.7.2	Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR)..	23
4.8	Análise Estatística - Análise de Correspondência (AC).....	23
5.	RESULTADOS	24
6.	DISCUSSÃO	29
7.	CONCLUSÕES	33
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – adesão agregativa
AAF– plasmídeo que expressa adesina
AD – adesão difusa
A/E – ligação e entumescimento (“attaching-and-effacing”)
AMP - ampicilina
APHA – America Public Health Association
CFL - cefalotina
DAEC – *Escherichia coli* de aderência difusa
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
eae – gene de ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)
EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
EAF - Plasmídeo de aderência de EPEC
EC – *Escherichia coli*
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
ERI - eritromicina
EST - estreptomicina
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
FAO – Food Agriculture Organization
GEN - gentamicina
H – antígeno flagelar
hab - habitante
HEp-2 – células de carcinoma epidermóide de laringe humana
HUS – síndrome hemolítica urêmica
K – antígeno capsular
Kg – quilograma
LAL - Adesão “localizada Like”
LEE – local de entumescimento no enterócito (“locus of enterocyte effacement”)

LT – termolábeis

MAR – Múltipla Resistência a Antimicrobianos

NEO - neomicina

O – antígeno somático

SLT – Shiga Like Toxin

ST – termoestáveis

STEC – *Escherichia coli* Shigatoxigênica

SUT – cotrimoxazol

Stx – Shigatoxina

TC – toxina colérica

TET – tetraciclina

TRI – trimetropim

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

VT – verotoxina

VTEC – *Escherichia coli* Verocitotoxigênica

WHO – “World Health Organization” – Organização Mundial da Saúde

µL – microlitro

°C – graus Celsius

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número de EIEC, EHEC e EPEC de isolados de <i>E. coli</i> obtidas de amostras de peixe e água de pesque-pagues da microbacia do Córrego Rico/SP.....	24
Tabela 2. Susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras de peixe e água de pesque-pagues da microbacia do Córrego Rico/SP.....	26
Tabela 3. Número de isolados de <i>E. coli</i> com múltipla resistência a antimicrobianos.....	27

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Localização dos cinco pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do Estado de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2009.....	18
Figura 2. Mapa perceptual resultante da Análise de Correspondência (AC)....	28

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PEIXE E
ÁGUA DE PESQUE-PAGUES**

RESUMO - Pesquisou-se a ocorrência de *E. coli* (EPEC, EIEC, EHEC) em água e peixe (pele, trato gastrointestinal e músculo) de pesque-pagues da microbacia do Córrego Rico, Jaboticabal, SP. A amostragem foi realizada entre os meses de abril e junho de 2008 em cinco pesque-pagues. Em cada um, foram colhidos dez exemplares de peixes adultos, e para análise foram colhidas amostras do músculo, do trato gastrointestinal e da superfície corpórea. As amostras de água foram colhidas em cinco pontos distintos de todos os pesque-pague. As colônias com características morfológicas relativas à *E. coli* isoladas do ágar MacConkey foram submetidas a confirmação bioquímica. Posteriormente, os isolados foram identificados sorologicamente como EPEC, EIEC e EHEC e realizado os testes de susceptibilidade a antimicrobianos e atividade hemolítica. Assim, foram isoladas 115 cepas de *E. coli*, entre as quais 81 (70%) foram sorogrupadas como EPEC, 5 (4%) como EHEC e 8 (7%) como EIEC. Os sorogrupos mais frequentes foram O125 (13,9%), O126 (11,3%) e O158 (10,4%). Dentre as amostras testadas, 60 (52%) apresentaram resistência simultânea a dois antimicrobianos. A Análise de Correspondência foi realizada com intuito de verificar as possíveis correspondências envolvendo o local de isolamento, sorogrupos e multirresistência e com isso pode-se observar que o músculo foi o local de isolamento com menor correlação aos demais fatores. Enquanto água, trato e pele apresentaram maior correspondência entre si. Assim, a presença de um alto número de isolados EPEC nesse estudo indica contaminação por enteropatógenos possivelmente advindos de fezes de animais, humanas e/ou águas contaminadas, representando risco à saúde dos frequentadores destes pesque-pagues e consumidores do pescado.

Palavras-chave: EPEC, sorogrupos, resistência, pesque-pague.

**SEROLOGICAL IDENTIFICATION AND PROFILE OF ANTIMICROBIAL
RESISTANCE OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM FISH AND
WATER FEE FISHING**

SUMMARY - The occurrence of *Escherichia coli* (EPEC, EIEC, EHEC) in water and fish (skin, gastrointestinal tract and muscle) was surveyed in fee fishing from the stream Rico micro-basin, Jaboticabal, São Paulo/Brazil. Samples were collected between april and june 2008 in five fee fishing. In each fee fishing, ten copies were collected from adult fish and for analysis were sampled muscle, gastrointestinal tract and body surface. Water samples were collected from five different points of all fee fishing. Thus, we isolated colonies from the MacConkey agar with morphological characteristics related to *E. coli* for biochemical confirmation. Subsequently, the isolates were identified serologically as EPEC, EIEC and EHEC and performed tests of antimicrobial susceptibility and hemolytic activity. It was found that among 115 strains of *E. coli* isolated, 81 (70%) were serologically classified as EPEC, 5 (4%) as EHEC and 8 (7%) as EIEC. The most common serogroups were O125 (13.9%), O126 (11.3%) e O158 (10.4%). From the 115 bacterial isolates, 60 (52%) were resistant to two antimicrobials. The Correspondence Analysis was performed to verify possible matches involving the location of isolation, serogroup and antimicrobial resistance and that can be observed that the muscle had lower correlation to other factors. While water and tract and skin had correlation with each other. Probably, the isolation of EPEC serogroups in this study indicates contamination by pathogens coming from animals, human and/or contaminated water, constituting a potential risk to the consumer health of these fee fishing.

Keywords: EPEC, serogroup, resistant, fee fishing.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma alternativa para incrementar os índices de consumo de proteínas de origem animal e o desenvolvimento sócio-econômico de um país. Além desses fatores, a busca por uma melhor qualidade de vida, por meio de práticas alimentares mais saudáveis e controle do peso, dentre outros, também contribuem para que o consumo de peixes tenha aumentado nos últimos anos.

Dentre as atividades aquícolas, surgem os pesque-pagues que alia a busca por lazer ao consumo do pescado. Estes empreendimentos desenvolveram-se bastante em regiões com alto número de nascentes e fontes de água. Porém, se o manejo for realizado de forma incorreta, excretas animais podem poluir as águas e prejudicar a saúde dos animais e seres humanos, com a presença de patógenos indesejáveis.

Os peixes podem ser vias de transmissão de agentes patogênicos ao seres humanos, como qualquer fonte de proteína de origem animal, pois a água, salgada ou doce, constitui ambiente natural de uma variedade de bactérias capazes de originar infecções no ser humano, embora o potencial para isso dependa de fatores, como: sobrevivência, latência e dose infectante do organismo e suscetibilidade do hospedeiro.

A penetração e estabelecimento de bactérias em diferentes tecidos e órgãos de peixes, como o aparelho digestivo, brânquias, músculo, rim, fígado e bexiga, foram relatados em ambientes aquáticos poluídos (PAL e DASGUPTA, 1992). Embora *Escherichia coli* não seja habitante natural da microbiota de peixes, essa bactéria tem sido isolada, com frequência, do estômago e intestinos desses animais (GUZMÁN et al., 2004).

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais homeotérmicos. O significado da sua presença nos alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos: indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto condições sanitárias insatisfatórias; e outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens

são comprovadamente patogênicas aos seres humanos e animais. Assim, a pesquisa laboratorial de *Escherichia coli* auxilia na detecção do real risco de uma toxinfecção alimentar por meio da água e dos alimentos fornecidos ao consumo (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Existem vários estudos mostrando a evolução da *Escherichia coli* como um importante patógeno gastrointestinal, no que diz respeito à transferência horizontal de genes, que traz como consequência diversidade biológica quanto aos seus fatores de virulência. Estudos comprovam que amostras isoladas de animais saudáveis podem ser potencialmente patogênicas para seres humanos, por possuírem fatores de virulência característicos para tal hospedeiro, mostrando ser um grande risco para a saúde pública.

Outro exemplo de manejo inadequado nas atividades aquícolas é o uso indiscriminado de antibióticos. Pois para controlar as doenças infecciosas, estratégias similares (por exemplo, vacinação e uso de agentes antimicrobianos) àquelas usadas em outras áreas da produção animal, são empregadas na aquicultura. Assim, o uso de antibióticos na aquicultura resulta no surgimento de reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos nesses ambientes e seu uso também representa risco à saúde pública, pois pode disseminar genes de resistência em microrganismos patogênicos aos seres humanos.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi estudar e identificar *E. coli* diarréiogênicas presentes em água e peixes de pesque pagues situados na microbacia do Córrego Rico/SP, por meio da sorologia e testes bioquímicos. Foram verificadas também a atividade hemolítica e a sensibilidade a antimicrobianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura e o consumo de pescado

Atualmente, apesar da crise econômica, a aquicultura é considerada um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo e que poderá contribuir, significativamente, com a crescente demanda mundial por pescado neste milênio (NAYLOR et al., 2009).

Segundo dados da FAO (Organização para Alimentação e Agricultura), a produção pesqueira mundial, de 19 milhões de toneladas em 1950, ultrapassou em 2004 os 141 milhões de toneladas. A produção brasileira cresceu de 150 mil toneladas para mais de 1 milhão de toneladas no mesmo período (FAO, 2006).

De acordo com DIAZ (2004), peixes e outros produtos aquícolas representam um terço do consumo mundial de proteína. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, o consumo anual brasileiro de pescado é, em média, 7,0 kg/hab.ano (OSTRENSKY et al., 2007).

Entre as justificativas para o baixo consumo está a comercialização em locais inadequados, o suprimento irregular, a suspeita de más condições higiênicas do produto e o elevado custo do produto no mercado, além da questão cultural (SANTOS, 2006). Pois segundo recomendações da OMS (Organização Mundial de Saúde) o consumo anual deve ser 12,0 Kg/hab.ano (WHO, 2009a)

Porém, com o aumento pela busca por uma alimentação saudável, o consumo do pescado no Brasil tende aumentar cada vez mais, devido sua composição lipídica ser rica em ácidos graxos insaturados e ter baixo teor de colesterol (PACHECO et al., 2004).

Segundo BARROS (2003), entende-se por pescado tudo aquilo que pode ser retirado de águas oceânicas ou interiores e que possa servir para alimentar o ser humano ou os animais. É um termo genérico, envolvendo peixes, crustáceos, moluscos, algas, etc.

2.2 Pesque-pagues

Lagos de pesca recreativa, conhecidos como pesque-pagues, emergiram no cenário brasileiro rural como uma atividade que une lazer e produção animal (LOPES et al., 2005).

Segundo SONODA (2002), os primeiros pesque-pagues surgiram no início da década de 80, nas regiões Sul e Sudeste, como uma tentativa por parte de alguns piscicultores para resolver problemas da comercialização de peixes, uma vez que o número de abatedouros ou de peixarias para comercialização de peixes vivos era incipiente. Em função da alta estrutura e tecnologia, a maioria destes empreendimentos não obteve sucesso, mas, por representar uma atividade de lazer, nos últimos 10 ou 15 anos esta atividade mostrou-se dinâmica, expandido-se de maneira significativa, principalmente ao redor dos centros urbanos mais populosos.

De acordo com PEZZATO e SCORVO FILHO (2000), na região Sudeste, os pesque-pagues são importantes canais de comercialização de peixes produzidos em cativeiro. Estes estabelecimentos armazenam espécies de peixes consideradas esportivas¹, nativas e exóticas, em lagos e oferecem a pesca como principal atrativo.

A atividade traz oportunidade de novas fontes de renda e de trabalho, além da pesca amadora e do lazer proporcionado, a combinação entre aquicultura e outras práticas agrícolas é considerada efeito positivo dessa atividade (ELER et al, 2006).

ELER et al. (2001) ressaltam que o sucesso econômico dessa atividade recreativa depende de boa manutenção da qualidade da água, sendo que essa qualidade pode ser influenciada por diversos fatores como, por exemplo, a origem da fonte de abastecimento de água e manejo alimentar.

De acordo com MERCANTE et al. (2004), a qualidade da água pode ser considerada por diversos aspectos, dentre os quais as preocupações com a saúde do usuário e a preservação do meio ambiente são de fundamental importância. E as técnicas de manejo empregadas nos locais destinados à pesca são fatores primordiais para a adequada pesca e lazer (LOPES, 2000).

¹ Espécies esportivas são aquelas que apresentam uma maior resistência ao serem capturadas no ato da pesca, espécies carnívoras geralmente são consideradas esportivas.

2.3 Poluição das águas e sua influência na qualidade do pescado

Os alimentos e a água podem servir como veículos de agentes patogênicos aos seres humanos. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), cerca de 88% dos casos de diarreia que ocorrem nos países em desenvolvimento são transmitidas por águas contaminadas (WHO, 2004). Pois a água está presente em quase todas as atividades da vida humana, direta ou indiretamente.

Apesar do peixe ser uma fonte de proteína saudável, também pode ser veiculador de doenças. Não somente por sofrer rápida deterioração, mas também devido a diversos microrganismos patogênicos que podem estar presentes nesse alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

A microbiota natural do peixe é relativamente uniforme, porém sofre forte influência das condições físicas, químicas e biológicas da água e das variações de temperatura. A microbiota do peixe vivo está diretamente relacionada à microbiota da água onde ele vive. No muco que recobre a superfície externa do seu corpo, guelras e intestino encontram-se uma ampla variedade de gêneros bacterianos (MÖLLERKE, 2002).

Segundo MURATORI et al. (2004) a microbiota de peixes recém capturados reflete o ambiente terrestre próximo aos ambientes hídricos e as condições microbiológicas do local de captura.

Por estarem em contato com a água os peixes podem albergar naturalmente alguns patógenos (MATTÉ et al., 2007). Dentre os agentes bacterianos amplamente distribuídos no ecossistema aquático, destacam-se aqueles pertencentes às famílias Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae, cuja presença nesse ambiente pode ser reconhecida pela sua detecção na pele, brânquias e intestinos dos peixes e, quando há desequilíbrio do sistema bactéria-hospedeiro-ambiente, podem estar envolvidos como agentes etiológicos primários, inclusive desencadeando epizootias em piscicultura (HUBER et al., 2004).

A presença de patógenos é identificada como um dos principais perigos que comprometem a qualidade dos produtos aquícolas. A sua ocorrência está relacionada a práticas impróprias de criação, poluição ambiental e hábitos culturais no preparo do alimento. Além disso, ao manejo indevido, tais como: má qualidade da

água, ração inadequada, falta de cuidados higiênicos com os peixes, com os tanques, com os viveiros e equipamentos e falta de treinamento de funcionários (ALEXANDRINO, 1998).

MORITA et al. (2006) ressaltam que a contaminação da água em sistemas pesqueiros também pode ocorrer pela entrada direta de fezes advindas de animais (aves, suínos, bovinos, cães e gatos) próximos aos lagos de pesca.

2.4 Uso de antimicrobianos na aquicultura e saúde pública

Outro fator importante a considerar no tocante a criação de peixes, é o uso indiscriminado de antimicrobianos para prevenir a disseminação de doenças. Não se tem o conhecimento deste manejo sobre o impacto ao meio ambiente e à saúde do ser humano. Os resíduos destes podem permanecer na carne do peixe destinado ao consumo humano, e levar ao aparecimento, na cadeia alimentar de bactérias resistentes a antibióticos (HEUER et al., 2009).

O ambiente aquícola é importante meio para a seleção de espécies bacterianas resistentes a vários antimicrobianos, em virtude da utilização de tais substâncias no tratamento e profilaxia de doenças bacterianas dos peixes, muitas vezes de forma indiscriminada (SAPKOTA et al., 2008).

O uso de antibióticos na aquicultura resulta no surgimento de reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos em peixes e outros animais aquáticos, bem como no ambiente aquático (AKINBOWALE et al., 2006). Segundo PIDDOCK (2006) tem-se observado aumento considerável no número de bactérias resistentes aos antimicrobianos, inclusive resistentes a mais de um, simultaneamente.

As consequências da resistência antimicrobiana em bactérias causadoras de doenças nos seres humanos incluem: aumento no número de infecção, na frequência de tratamento sem sucesso e na severidade da infecção (BARZA e TRAVERS, 2002).

Os mecanismos de resistência são complexos e numerosos (AMINOV et al., 2001). As bactérias podem tornar-se resistentes por meio de mutações ou transferências horizontais de genes, que codificam bombas de efluxo, enzimas

degradativas e modificadoras, e proteínas de proteção ribossomal (KHACHATRYAN et al., 2004).

O aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambientes de produção animal e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos nesta atividade (LIMA et al., 2006).

2.5 Peixe como origem de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças de origem alimentar pode ser definida como aquela de natureza infecciosa ou tóxica, causada por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (WHO, 2009b).

Existem, basicamente, duas maneiras dos microrganismos provocarem doenças nos consumidores: através de intoxicação, quando se refere a ingestão da toxina previamente formada pelo microrganismo no alimento – estas patologias são incluídas no grupo das denominadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs); ou infecção provocada pela presença de células em concentração suficientes para se tornarem prejudiciais à saúde (VIEIRA et al., 2004).

As doenças veiculadas por alimentos constituem-se em um dos problemas de saúde mais disseminados e uma importante causa de redução da produtividade econômica. A importância destas doenças como um problema real de saúde da população é, no geral, subestimada porque a verdadeira incidência é de difícil avaliação e a severidade das consequências à saúde ou à economia não são devidamente analisadas (TESSARI et al., 2003).

Os contaminantes dos alimentos possuem 2 origens: endógena e exógena. Os contaminantes de origem endógena já se encontram nos alimentos antes de sua obtenção e os de origem exógena são contaminantes adicionados nos alimentos durante sua manipulação (UNGAR et al., 1992).

São importantes causas de infecções e intoxicações alimentares os contaminantes de origem exógenas onde estão contidos os microrganismos como *E.*

coli. Portanto, a grande preocupação é impedir que estes microrganismos sejam adicionados à matéria-prima e se multipliquem (GERMANO e GERMANO, 2003).

O pescado é um importante veiculador de agentes patogênicos, responsáveis por diversas enfermidades nos seres humanos, notadamente as toxinfecções. Pode-se classificar os contaminantes presentes no pescado, em microrganismos deteriorantes, microrganismos indicadores de higiene ou de processamento, microrganismos indicadores de manipulação inadequada, microrganismos indicadores de contaminação fecal, microrganismos potencialmente capazes de provocar doenças transmitidas pelo consumo de pescado e microrganismos aptos em liberar toxinas capazes de causar intoxicações ao consumidor (PIMENTEL e PANETTA, 2003).

Muitas espécies enteropatogênicas são encontradas em peixes, inclusive aqueles mantidos sob refrigeração (DALTON et al., 2004). Peixes e frutos do mar estão envolvidos, nos Estados Unidos, em 19% de doenças causadas por alimentos de origem conhecida (OLSEN et al., 2000).

Na Europa, entre os anos de 1993 e 1998, a contribuição de pescado em surtos de doenças transmitidas por alimentos variou entre 0,3 a 12,2% dentre 16 países pesquisados (TIRADO e SCHMIDT, 2000).

Dados australianos mostram que dentre 173 surtos de origem alimentar, com tipo de alimento implicado conhecido, depois da carne associada em 64 (30%) surtos, o segundo veículo mais frequentemente implicado entre 1995 e 2000 naquele país foram os peixes em 34 (16%) surtos, seguido pelo frutos do mar responsáveis por 13 (6%) deles (HALL et al., 2005).

No Brasil, entre 1999 e 2004, em aproximadamente 33% (1.243/3.737) dos surtos não foi possível determinar o tipo de alimento implicado, enquanto peixes e frutos do mar implicados em 1% e 0,37% destes surtos, respectivamente (CARMO et al, 2005).

Mesmo na ausência de informações confiáveis sobre o número de casos de doenças provocadas por alimentos contaminados, sabe-se que o pescado está fortemente relacionado com toxinfecções, principalmente quando é oferecido em locais sem condições de salubridade.

2.6 *Escherichia coli*

Theodore Escherich (1855) descreveu um microrganismo que se encontrava em altas densidades nas fezes humanas e foi por ele nomeado *Bacterium coli*. No início do século passado (1912), *Bacterium coli* já era utilizada como indicador da qualidade sanitária da água. Na década de 1950, esta bactéria passou a ser denominada *Escherichia coli* pelos microbiologistas e foi escolhida como modelo para estudos de processos biológicos básicos, tais como vias metabólicas, regulação gênica, transdução de sinais, estrutura de parede celular e conjugação (KUHNER et al., 2000).

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. A espécie *E. coli* é um dos principais componentes da família *Enterobacteriaceae* (KUHNER et al., 2000).

Dentre suas principais características, destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás; a maioria também fermenta a lactose. Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com os polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (MENG et al., 2001).

Esta espécie compreende grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H. O antígeno O identifica o sorogrupo das cepas e a combinação de antígeno O e H identifica o sorotipo. Entretanto, nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo (MENG et al., 2001).

A maioria das cepas de *E. coli* é habitante natural do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos, e usualmente apresentam-se como bactéria comensal. Entretanto, existem amostras de *E. coli* patogênicas que podem causar diarreia e outras doenças em humanos e animais, pois expressam fatores de virulência que estão envolvidos em sua patogênese (SANTIAGO et al., 2005).

As cepas de *E. coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como

microrganismo indicador, a presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico transmitidos por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novos significados em especial quando as condições do meio em que se encontra permitem sua multiplicação (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Desde 1945, quando foi verificado o primeiro caso de diarreia associada a uma linhagem de *E. coli*, o conhecimento a respeito de como esta bactéria causa diarreia tem aumentado muito. Como todos os microrganismos que causam diarreia, *E. coli* são ingeridas com alimentos e/ou águas contaminados com fezes humanas ou animais. Os mecanismos de patogenicidade de *E. coli* são complexos e envolvem um grande número de fatores de virulência, que variam em suas diferentes categorias. Muitos destes fatores parecem ter sido adquiridos de outros patógenos entéricos, como *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* (GILLIGAN, 1999). Toxinas e fímbrias são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli*. Algumas toxinas são intimamente relacionadas com determinadas categorias desta bactéria (KUHNERT et al., 2000).

As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal e causadora de diarreia ou disenteria, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e são classificadas em seis classes: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas, enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004).

2.7 *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC)

O subgrupo EPEC é o maior causador de surtos de diarreia infantil em países subdesenvolvidos (DEAN et al., 2005).

Geralmente, a transmissão ocorre por alimentos contaminados e a colonização acontece no intestino delgado onde a bactéria se fixa firmemente às células epiteliais causando lesões típicas chamadas “attaching and effacing” (A/E)

(KAPER et al., 2004). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece ligada (MOXLEY e SMITH, 2010).

CLARKE et al (2003) propõe que a formação de lesões A/E resulta em uma redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal o que leva ao rompimento do equilíbrio eletrolítico e, posteriormente, a diarreia. Provavelmente a diarreia causada por EPEC resulta de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda da superfície de absorção (SHAW et al., 2005).

As cepas EPEC são divididas em dois grupos: EPEC típicas (presença de gene *eae* e plasmídeo EAF) e EPEC atípicas (presença somente do gene *eae*). As EPEC típicas, ou simplesmente EPEC, são bastante homogêneas em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídeo EAF. Por outro lado, as EPEC atípicas não são portadoras do plasmídeo EAF, mas possuem o gene *eae* e demais fatores de virulência codificados na região LEE. Diversos estudos avaliaram a importância epidemiológica de cepas EPEC atípicas em doenças gastrointestinais (NGUYEN et al., 2006).

As EPEC típicas e atípicas também diferem no padrão de adesão nas células. As EPEC típicas apresentam somente o padrão de adesão localizada, enquanto que as atípicas apresentam o padrão de adesão "localizada Like" (LAL), podendo também apresentar adesão difusa (AD) e adesão agregativa (AA) (TRABULSI et al., 2002).

Segundo KOBAYASHI et al. (2000), no Brasil a diarreia ainda é um importante problema de saúde pública e em várias partes do país linhagens de EPEC tem sido isoladas de crianças de baixo nível sócio-econômico durante episódios de diarreia. Estes autores verificaram em estudos realizados no Hospital Universitário de Londrina - PR que dentre as 442 amostras de *E. coli* isoladas de crianças menores de dois anos de idade com diarreia, 18,6% dos isolados apresentaram um ou mais fatores de virulência características para EPEC.

MORENO et al. (2010) observaram frequência de 11% de *E. coli* EPEC dentre 2344 isolados de fezes de crianças com diarreia em um hospital no nordeste brasileiro, sendo EPEC típicas e atípicas responsáveis por 2% e 9% dos casos, respectivamente.

2.8 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Escherichia coli enterohemorrágica é causadora de uma variedade de doenças, que vão desde leve diarreia a doenças graves como a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (NAKANISHI et al., 2009).

O sorogrupo mais comum e conhecido é denominado O157. EHEC inclui uma diversa população de *E. coli* produtoras de shigatoxinas, sendo o bovino seu principal reservatório. O consumo de alimentos de origem bovina é o principal responsável por surtos alimentares (MANNING et al., 2008). Porém, outras fontes como alface, brotos de rabanetes, espinafre, maçã, sidra, consumo ou uso recreativo de água, o contato direto com bovinos ou excretas de animais e uso recreativo de pastagens também são associados a infecções esporádicas e a surtos de diarreias em seres humanos (RANGEL et al., 2005)

Segundo CLARKE (2001), o principal componente de virulência desse grupo é a produção de uma toxina que tem atividade citotóxica sobre células Vero e, é denominada Verotoxina (VT), essa toxina também é reconhecida toxina Shiga (Stx) ou toxina “Shiga-like” (SLT) devido sua similaridade com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. Dois principais grupos antigênicos distintos da toxina ocorrem e são identificados com Stx1 que é similar a toxina tipo I de *S. dysenteriae*, e a Stx2 que apresenta 11 variantes distintas (WANI, 2007). Portanto, o subgrupo da espécie que comumente é denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), é também nomeado de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* verocitotoxigênica (VETEC) (GARCIA-ALJARO et al., 2005).

Das cepas de *Escherichia coli* que produzem shigatoxinas, existem as que são altamente patogênicas aos seres humanos e podem pertencer a uma extensa gama de sorogrupos O, sendo as *E. coli* enterohemorrágicas O157 as responsáveis pela maioria dos casos mais graves. Trata-se de microrganismos que são uma

ameaça à saúde pública, pela gravidade das patologias que provocam, como a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos (KARMALI et al., 2009).

Assim como EPEC, *E. coli* O157:H7 pode aderir ao epitélio intestinal e produzir a característica lesão A/E. NATARO e KAPER (1998) demonstraram que as EHEC produzem intimina que também é codificada pelo gene *eae*. Acredita-se que os fatores de virulência adicionais desta bactéria tenham sido adquiridos por transferência horizontal e recombinação gênica (COBURN et al., 2007).

2.9 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

As bactérias do grupo ETEC são importantes causas de diarreia em países subdesenvolvidos onde as condições de saneamento são precárias. Além disso, ETEC é considerada um dos principais agentes etiológicos da chamada “diarreia dos viajantes”, acometendo indivíduos que se deslocam de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico, atingindo pessoas de todas as faixas etárias (MENG et al., 2001).

Para VICENTE et al. (2005), a virulência das linhagens de ETEC é devido a habilidade da bactéria de produzir enterotoxinas e expressar adesinas de superfície que permitem a colonização das células do epitélio intestinal.

No aparelho digestivo, estas bactérias colonizam a porção distal do intestino delgado e produzem enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarreica (HINSON e WILLIAMS, 1989). As enterotoxinas produzidas por este grupo de *E. coli* pertence à classe de toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), que se diferenciam na estrutura, antigenicidade e mecanismos de ação (SEARS e KAPER, 1996).

A enterotoxina termolábil possui estrutura e função semelhante à toxina colérica (TC) de *Vibrio cholerae* e é dividida em duas subclasses: LT-I e LTII. A toxina LT-I é expressa por amostras de *E. coli* que são patogênicas aos seres humanos e animais, principalmente suínos, enquanto que a LT-II é encontrada principalmente em bovinos e raramente em humanos. A ação destas toxinas baseia-se na estimulação da enzima adenil-ciclase, promovendo uma elevação dos níveis

de AMPc nos enterócitos, o que leva à perda de potássio e íons bicarbonato pela célula, com conseqüente secreção de líquido para a luz intestinal e diarreia (KAPER et al., 2004).

As enterotoxinas termoestáveis (STa e STb) são capazes de resistir ao tratamento térmico, a 100°C por 30 minutos, sendo que STa é solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas. Por outro lado, a enterotoxina STb é insolúvel em metanol, ativa em alça ligada intestinal de suínos de 5 a 7 semanas e estimula secreção intestinal por um mecanismo que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos, mas eleva concentrações citosólicas de Ca^{2+} , estimula a liberação de prostaglandina E2 e estimula a liberação de serotonina, mecanismos que permitem aumento de secreção de íons com conseqüente diarreia (KAPER et al., 2004).

2.10 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa (EAEC) é reconhecida como um patógeno emergente que causa diarreia em crianças e adultos em todo o mundo (NGUYEN et al., 2006). Estudos envolvem EAEC em casos de diarreia persistente, principalmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (BERNIER et al., 2002). A principal característica da EAEC é sua capacidade de apresentar um padrão de aderência, em células HEp-2 e HeLa, caracterizado pela presença de agregados de células bacterianas que aderem à superfície celular bem como à superfície da lamínula, em um arranjo semelhante a tijolos empilhados – aderência agregativa (AA) (NATARO et al., 1987).

Esta característica permite que se diferencie amostras EAEC de amostras EPEC ou DAEC. Cepas EAEC são heterogêneas tanto pelos sintomas desenvolvidos pelas pessoas infectadas, quanto pelos genes de virulência. Diversos tipos de fímbrias têm sido descritos para EAEC, embora apenas duas delas, denominadas “Aggregative adherence fimbriae I (AAF/I) e Aggregative adherence fimbriae II (AAF/II)” tenham sido mais bem caracterizadas (HUANG e DUPONT, 2004).

Contudo, dados epidemiológicos indicam que somente uma minoria de cepas EAEC (10-15%) isoladas de diferentes regiões do mundo possuem AAF/I e/ou AAF/II

(HARRINGTON et al., 2006). Isto sugere a existência de outras adesinas, ainda não caracterizadas, em um grande percentual de cepas EAEC.

Uma terceira estrutura fimbrial (AAF/III) codificada por plasmídio foi isolada da cepa EAEC 55989. Em contraste com a morfologia de feixes de AAF/I e AAF/II, a fímbria AAF/III parece com um filamento longo e flexível que, além da adesão em células, também promove a agregação bacteriana (BERNIER et al., 2002).

Para OKEKE e NATARO (2001), nenhum dos fatores de virulência de EAEC é encontrado em todas as amostras e muitos não são únicos dessa categoria. Isto demonstra a dificuldade para se estabelecer definição genotípica e/ou propor um modelo exato de sua patogenicidade.

2.11 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

A EIEC acontece mais comumente em adultos e alguns estudos apontam surtos relacionados à ingestão dos alimentos e/ou água contaminados. Entretanto, acredita-se que a via de transmissão mais comum seja o contato interpessoal (MENG et al., 2001). Essas cepas são capazes de penetrar em células epiteliais do cólon e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*. A maioria delas apresenta características bioquímicas peculiares que a torna diferente das demais cepas de *E. coli*, tornando-a semelhante à *Shigella*, como a incapacidade de descarboxilar a lisina e ausência de flagelos. Os limitados sorogrupos conhecidos são O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173 (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Cepas EIEC invadem o intestino através das células M do sistema linfático específico da mucosa (MALT), com subsequente formação de vesículas denominadas vacúolos endocíticos, ocorrendo a lise desses vacúolos e alterações do citoesqueleto celular que favorecem o movimento bacteriano. Este movimento dentro do citoplasma da célula hospedeira é mediado pela nucleação da actina celular em uma espécie de “cauda” que se forma em um dos pólos da bactéria. Posteriormente, mais actina é adicionada à cauda, o que “impulsiona” a bactéria através do citoplasma, geralmente na direção lateral, até alcançar a célula adjacente através de protuberâncias na membrana citoplasmática (PENG et al., 2009).

A invasão da mucosa por EIEC provoca intensa reação inflamatória tecidual e disentérica e, embora EIEC seja invasiva, sua disseminação através da submucosa é rara (KAPER et al., 2004). Muitas destas características da patogênese de EIEC são resultado dos múltiplos efeitos do sistema de secreção tipo III, que secreta as proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD e medeiam eventos de sinalização, rearranjos do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico e outras ações (TRAN VAN NHIEU et al., 2000).

2.12 *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC)

Cepas de *E. coli* pertencentes a esse grupo são identificadas pelo seu padrão de aderência difuso em cultura de células epiteliais “in vitro” e foram reconhecidas como a sexta classe de *E. coli* diarreio gênica (NATARO e KAPER, 1998).

Várias estruturas envolvidas na virulência desse grupo são relatadas. De fato, quatro adesinas relacionadas com o fenótipo de aderência difusa estão bem caracterizadas: F1845 (BILGE et al., 1989), AIDA-I (BENZ e SCHMIDT, 1992), CF16k (JALLAT et al., 1994), e uma proteína de 57 kDa (YAMAMOTO et al., 1996). Contudo, não há dados suficientes para confirmar o papel dessas adesinas na diarreia (TADDEI et al., 2003).

A importância da categoria DAEC em infecções do trato urinário também tem sido descrita (NOWICKI et al. 2001). Estudos mostram que algumas cepas DAEC carregam fatores de virulência encontrados em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (JOHNSON e STELL, 2000).

SERVIN (2005) propôs uma nova classificação para *E. coli* que aderem difusamente em células. De acordo com este autor, DAEC podem ser divididas em típicas e atípicas. A classe típica incluiria cepas que carregam adesinas da família Dr com idêntica organização gênica, permitindo ligação ao DAF, enquanto a classe atípica englobaria cepas que não só possuem adesinas Dr, mas também outros tipos de adesinas que promovem aderência difusa e que não possuem capacidade de ligação ao DAF. Dados a respeito da relação entre cepas DAEC e diarreia permanecem controversos e a patogenicidade entérica deste grupo ainda é questionável (TADDEI et al., 2003).

3. OBJETIVOS

- Isolar e identificar *Escherichia coli*, por meio de testes bioquímicos, em amostras de água e peixe de pesque-pagues da microbacia do Córrego Rico/SP.
- Determinar a frequência de sorogrupos diarreiogênicos de *E. coli* (EPEC, EHEC e EIEC) pela técnica de aglutinação em lâmina.
- Avaliar a atividade hemolítica das cepas de *Escherichia coli* isoladas.
- Determinar o perfil de susceptibilidade a 14 antimicrobianos por meio da técnica de disco difusão
- Verificar a correlação entre o local de isolamento, resistência antimicrobiana e sorogrupo através da Análise de Correspondência. .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, colheita e transporte das amostras de água e peixe

As amostras de água dos viveiros e dos peixes foram realizadas entre abril e junho de 2008, durante o período da manhã. Foram utilizados para amostragem cinco pesque-pagues localizados na região da microbacia do Córrego Rico, região Nordeste do Estado de São Paulo (Figura 1).

As amostras de água do viveiro foram colhidas, em cinco pontos distintos dos mesmos, em frascos estéreis para análise e transportadas em caixa isotérmica com gelo, perfazendo um total de 25 amostras de água.



Figura 1. Localização dos cinco pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do Estado de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2009.

Em relação às amostras de peixe, foram colhidas, aleatoriamente, dez exemplares de peixes adultos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) em todos os pesque-pague, com o auxílio de tarrafas e/ou varas de pescas, totalizando 50 amostras de peixe. Em seguida os peixes capturados foram colocados em sacos plásticos esterilizados e expostos a imersão em gelo para serem sacrificados e analisadas as diferentes partes.

O preparo das amostras e a análise foram realizados no Laboratório de Microbiologia localizado no Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP-FCAV).

4.2 Preparo das amostras de peixe

4.2.1 Enxaguadura da pele

Foram adicionados 200 mL de água peptonada 0,1% esterilizada no saco plástico contendo um peixe. Em seguida o peixe foi massageado durante um minuto para transferir os microorganismos da pele para a água peptonada. Desta maneira foi obtida uma amostra de enxaguadura para análise (APHA, 2001).

4.2.2 Tecido muscular

Antes de serem dissecados, a pele do peixe foi lavada com álcool 70% para evitar contaminação do seu interior. Em seguida os peixes foram dissecados dentro de um fluxo laminar e com o auxílio de instrumentos esterilizados, tomando o devido cuidado para que não ocorresse rompimento do trato gastrointestinal. Foram utilizados 25g de músculo de cada peixe, pesados em placas de Petri estéreis, realizando a diluição da mesma com a adição de 225 mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir dessa solução homogeneizada foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} para análise (APHA, 2001).

4.2.3 Trato gastrointestinal

Todo o conteúdo do trato gastrointestinal do peixe foi retirado e pesado. Para a obtenção da diluição 10^{-1} , foi adicionada água peptonada 0,1% em volume proporcional. Novas diluições decimais foram realizadas transferindo-se 1 mL da

diluição anterior para tubos contendo 9 mL do diluente até obter a diluição 10^{-4} (APHA, 2001).

4.3 Isolamento de *Escherichia coli*

Após a diluição seriada da água, dos lavados superficiais, do tecido muscular e do trato gastrointestinal, alíquotas das diluições foram semeadas em Caldo Lauril Sulfato de Sódio² e incubadas por 24-48h a 37°C. Em seguida, 100µl das amostras foram inoculados em 5 mL de caldo EC³ e incubadas por 24h a 44,5°C.

As amostras positivas para caldo EC foram semeadas em ágar MacConkey⁴ e incubadas a 37° C por 24 horas. De cada amostra, foram colhidas três colônias sugestivas de *E. coli* e identificadas bioquimicamente como pertencentes à espécie *E. coli* com base nos testes de produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges-Proskauer e utilização de citrato. Posteriormente, as colônias positivas para *E. coli* foram identificadas sorologicamente e realizados testes de atividade hemolítica e de susceptibilidade a antimicrobianos.

4.4 Identificação bioquímica de *Escherichia coli*

4.4.1 Indol

O indol é um dos produtos de degradação do metabolismo do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase podem clivar o triptofano e, desse modo, produzir indol, ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado em um meio de prova com triptofano, observando-se o aparecimento de cor vermelha após a adição de uma solução que contenha p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Ehrlich ou de Kovac). Para testar o indol, os isolados foram inoculados com auxílio de uma agulha de sementeira em tubos de ensaio contendo o caldo triptofano, e incubados a 37°C por 24 horas. Ao término deste período, foram adicionadas 5 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo. O desenvolvimento

² Difco, Detroit, USA

³ Difco, Detroit, USA

⁴ Oxoid, Hampshire, UK

de uma cor vermelha brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo triptofano indica a presença de indol. (KONEMAM, 2001).

4.4.2 Prova do vermelho de metila

Esta prova atesta se alguns microrganismos produzem e mantêm estáveis produtos ácidos finais da fermentação da glicose. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo caldo MR-VP e incubados por 72 horas a 35°C. Na leitura, foram adicionadas cinco gotas de uma solução de vermelho de metila. O aparecimento da cor vermelha caracteriza a prova como positiva (SIQUEIRA, 1995).

4.4.3 Prova de Voges-Proskauer

Este teste é baseado na conversão de acetil metil carbinol (acetoína) em diacetil pela ação de hidrólise de potássio e oxigênio atmosférico. O diacetil é convertido a um complexo vermelho sob a ação catalítica de α -naftol e creatina. A formação de acetoína e butileno glicol é uma via alternativa do metabolismo do ácido pirúvico. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo caldo MR-VP e incubados por 48 horas a 35°C. Posteriormente, foram adicionados 0,2mL da solução de hidróxido de potássio a 40% e 0,6mL da solução de alfa-naftol a 5%. Foram aguardados 30 minutos com os tubos abertos e inclinados para observar a produção da coloração avermelhada que caracteriza a prova como positiva (KONEMAN, 2001).

4.4.4 Utilização de citrato

Esta prova bioquímica é utilizada para caracterizar microrganismos capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, o que provoca a elevação do pH do meio de cultivo devido a metabolização do íon citrato. O aparecimento de cor azul no meio de prova após 24 horas de incubação a 35°C indica a presença de produtos alcalinos e um resultado positivo na prova de utilização de citrato (SIQUEIRA, 1995).

4.5 Atividade Hemolítica

Foi avaliada a atividade hemolítica placa de Petri contendo Ágar sangue com 5% de sangue de carneiro. As cepas foram semeadas no meio e incubadas a 37°C por 24 horas para avaliação do halo de hemólise.

4.6 Detecção dos sorogrupos de *E. coli* por aglutinação em lâmina

Para determinação dos sorogrupos EHEC foi utilizado o soro anti *E. coli* O157. Para determinação dos sorogrupos EPEC foi utilizado o soro polivalente anti *E. coli* enteropatogênica clássica: Polivalente A: Anti O26, O55, O111, O119; Polivalente B: Anti O114, O125, O142, O158; Polivalente C: Anti O86, O126, O127, O128; e seus respectivos monovalentes. Para determinação dos sorogrupos EIEC foi utilizado o soro polivalente anti *E. coli* enteroinvasora: Polivalente A: Anti O28ac, O29, O136, O144, O152; Polivalente B: Anti O112ac, O124, O143, O164, O167. A suspensão bacteriana usada foi bastante espessa e a proporção suspensão/anti-soro foi de uma alçada de cultura para uma gota normal dos soros PROBAC⁵, seguindo recomendações do fabricante. A presença de aglutinação, verificada em aglutinoscópio, foi considerada resultado positivo para essa prova.

4.7 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

4.7.1 Antibiograma

Para a realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos, as cepas de *E. coli* foram repicadas em tubos contendo 5mL de caldo tripicase soja e incubadas a 37°C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4mL de solução salina esterilizada. A seguir, as culturas diluídas na concentração 1/2 da escala de MacFarland foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados os polidiscos contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37°C por meio da medida dos halos de inibição, com a utilização de

⁵ PROBAC DO BRASIL, São Paulo, Brasil

régua milimetrada (BAUER et al., 1966) e descrito pelo “National Commite for Clinical Standards” (NCCLS, 2003).

Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), estreptomicina (10µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), novobiocina (5µg), cotrimoxazol (25µg), tetraciclina (30µg), trimetropim (5µg), ciprofloxacina (5µg) e norfloxacina (10µg).

4.7.2 Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR)

Para determinação da multirresistência foi utilizado o índice MAR (múltipla resistência a antimicrobianos), que é definido como a/b , em que “a” é o número de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente e “b” o número de antimicrobianos aos quais o isolado foi exposto (KRUMPERMAN, 1983).

4.8 Análise Estatística - Análise de Correspondência (AC)

A Análise de Correspondência (AC) permite a visualização, como em um mapa geográfico, das proximidades (similaridades ou dissimilaridades) entre os estímulos propostos no trabalho de pesquisa. A análise de correspondência usa o conceito básico Qui-quadrado para padronizar as frequências e formar a base para as associações desejadas pelo pesquisador. A variação total dos dados é denominada inércia, sendo esta variação decomposta em cada eixo (ou dimensão) do gráfico. Assim, a inércia associada a cada dimensão do gráfico nos informa qual é a proporção da variação total que aquele eixo está explicando. A primeira dimensão do gráfico do mapeamento perceptual exibe a maior quantidade de inércia sendo o mais relevante, a segunda dimensão exibe a maior quantidade de inércia depois da primeira sendo o segundo mais importante e assim sucessivamente sendo o último o menos importante (HAIR et al., 2005).

A Análise de Correspondência foi realizada com intuito de verificar as possíveis correspondências envolvendo o local de isolamento (água, pele, trato gastrointestinal e músculo), sorogrupos (EPEC, EIEC e EHEC) e resistência a um (R_1), dois (R_2), três (R_3) e quatro (R_4) antimicrobianos, bem como as amostras não identificadas pela sorologia (ND).

5. RESULTADOS

Através das provas bioquímicas foram identificados 115 isolados de *E. coli*, sendo 19 da água e 96 do peixe, dos quais 26 foram isolados da superfície corpórea (pele), 65 do trato gastrointestinal e 5 do músculo. A atividade hemolítica não foi verificada em nenhum dos isolados.

Em relação à sorologia, cinco (4%) isolados apresentaram aglutinação positiva para EHEC, enquanto oito (7%) foram positivos para EIEC. Oitenta e um (70%) isolados mostraram aglutinação positiva para EPEC. Os sorogrupos mais frequentes na água foram O125 e O126; na pele O125, O128 e O86; no trato O125, O126 e O55; e no músculo O119 e O158 (Tabela 1).

Tabela1. Sorogrupos de EIEC, EHEC e EPEC isolados de amostras de peixe e água de pesque-pagues, microbacia do Córrego Rico/SP.

Fontes	Sorogrupos		
	EIEC	EHEC (O157)	EPEC
Água	2	2	4 (O125); 3 (O126); 1 (O128); 2 (O158); 1 (O114); 2 (O142)
Pele	3	2	6 (O125); 1 (O126); 3 (O128); 2 (O158); 1 (O114); 1 (O55); 3 (O86)
Trato gastrointestinal	3	1	6 (O125); 9 (O126); 5 (O128); 5 (O158); 5 (O114); 8 (O55); 3 (O86); 2 (O119); 3 (O142)
Músculo	0	0	3 (O158); 2 (O119)

O antibiograma apontou a alta sensibilidade de todos os isolados aos agentes: ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina e norfloxacina. Entretanto, todos os isolados mostraram resistência a novobiocina.

Na Tabela 2 está apresentada a susceptibilidade encontrada aos demais agentes antimicrobianos avaliados.

Para os antimicrobianos tetraciclina, trimetropim e cotrimoxazol, 89,5% dos isolados obtidos da água apresentaram sensibilidade e 10,5% de resistência. A ampicilina foi o único antimicrobiano cujos isolados foram 100% sensíveis. Já para eritromicina e estreptomicina, 63,2% e 10,5% dos isolados da água foram resistentes, respectivamente.

Dos 26 isolados da pele do peixe, apenas para neomicina não foi observado resistência, porém 61,5% apresentaram perfil intermediário de resistência. Para ampicilina, estreptomicina e tetraciclina, 11,5% dos isolados foram resistentes, enquanto 15,4% apresentaram resistência para cefalotina. Semelhante aos isolados da água, o maior número de isolados com perfil de resistência foi para eritromicina (53,9%).

Em relação aos isolados do trato gastrointestinal do peixe, 100% apresentaram sensibilidade para tetraciclina, trimetropim e cotrimoxazol e 70,8% foram resistentes a eritromicina. Apesar de poucos isolados do trato gastrointestinal apresentar perfil de resistência, 78,5%, 47,7% e 27,7% apresentaram perfil intermediário de resistência para neomicina, estreptomicina e cefalotina, respectivamente.

Nos isolados do músculo, apenas para os agentes antimicrobianos eritromicina, cefalotina e gentamicina foram observados isolados com perfil de resistência. Enquanto 100% dos isolados apresentaram sensibilidade para ampicilina, tetraciclina, trimetropim e cotrimoxazol.

Tabela 2. Susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. coli* obtidos de amostras de peixe e água em pesque-pagues, microbacia do Córrego Rico/SP.

Fontes	S*	Antimicrobianos N (%)								
		AMP	GEN	NEO	EST	TET	TRI	SUT	CFL	ERI
Água	S	19 (100)	18 (94,7)	12 (63,2)	12 (63,2)	17 (89,5)	17 (89,5)	17 (89,5)	10 (52,6)	7 (36,8)
	SI	0 (0)	1 (5,3)	7 (36,8)	5 (26,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (47,4)	0 (0)
	R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10,5)	2 (10,5)	2 (10,5)	2 (10,5)	0 (0)	12 (63,2)
Pele	S	23 (88,5)	23 (88,5)	10 (38,5)	17 (65,4)	23 (88,5)	25 (96,2)	25 (96,2)	16 (61,5)	12 (46,1)
	SI	0 (0)	2 (7,7)	16 (61,5)	6 (23,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (23,1)	0 (0)
	R	3 (11,5)	1 (3,8)	0 (0)	3 (11,5)	3 (11,5)	1 (3,8)	1 (3,8)	4 (15,4)	14 (53,9)
Trato gastrointestinal	S	64 (98,5)	61 (92,3)	13 (20)	33 (50,8)	65 (100)	65 (100)	65 (100)	39 (60)	19 (29,2)
	SI	1 (1,5)	5 (7,7)	51 (78,5)	31 (47,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (27,7)	0 (0)
	R	0 (0)	0 (0)	1 (1,5)	1 (1,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (12,3)	46 (70,8)
Músculo	S	5 (100)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	2 (40)	0 (0)
	SI	0 (0)	0 (0)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)
	R	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	5 (100)

* Susceptibilidade: S - sensibilidade; SI - sensibilidade intermediária; R - resistência
 AMP - ampicilina; GEN - gentamicina; NEO - neomicina; EST - estreptomicina;
 TET - tetraciclina; TRI - trimetopim; SUT - cotrimoxazol; CFL - cefalotina; ERI - eritromicina

A Tabela 3 apresenta os valores para o Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR). Assim, observou-se que dos 115 isolados analisados, 60 (52,0%) apresentaram índice MAR 0,14 (resistência a dois antimicrobianos) e 30 (26,0%) apresentaram MAR 0,07 (resistência a um antimicrobiano).

Em relação aos isolados da água, 47,4% apresentaram MAR 0,14. Enquanto 26,3% e 21,0% apresentaram MAR 0,07 e 0,21, respectivamente.

Os isolados da pele apresentaram maiores valores para MAR, pois 11,5% isolados apresentaram MAR 0,29 (resistência a quatro antimicrobianos) e 23,1% apresentaram MAR 0,21 (resistência a três antimicrobianos).

Tabela 3. Resistência Múltipla a Antimicrobianos de isolados de *E. coli* obtidos de amostras de peixe e água em pesque-pagues, microbacia do Córrego Rico/SP.

Fontes	Índice MAR (%)			
	0,07	0,14	0,21	0,29
Água	5 (26,3)	9 (47,4)	4 (21,0)	1 (5,3)
Pele	8 (30,8)	9 (34,6)	6 (23,1)	3 (11,5)
Trato gastrointestinal	17 (26,2)	39 (60,0)	9 (13,8)	0 (0,0)
Músculo	0 (0,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	0 (0,0)
Total	30 (26,0)	60 (52,0)	21 (18,0)	4 (4,0)

Apesar do maior número de isolados do trato gastrointestinal, apenas 9 (13,8%) apresentaram MAR 0,21. Sendo que a maioria dos isolados (60,0%) apresentaram MAR 0,14. Entre os isolados do músculo, os índices de MAR apresentados foram 0,14 (60,0%) e 0,21 (40,0%).

A relação entre o local de isolamento, perfil de multirresistência e sorogrupo foi avaliada através da Análise de Correspondência (Figura 1). A qualidade do mapa perceptual é medida pela quantidade de inércia retida nas duas dimensões consideradas. Neste estudo a retenção foi de 93,7% sendo 75,2% retida na primeira dimensão e 18,4% retida na segunda dimensão.

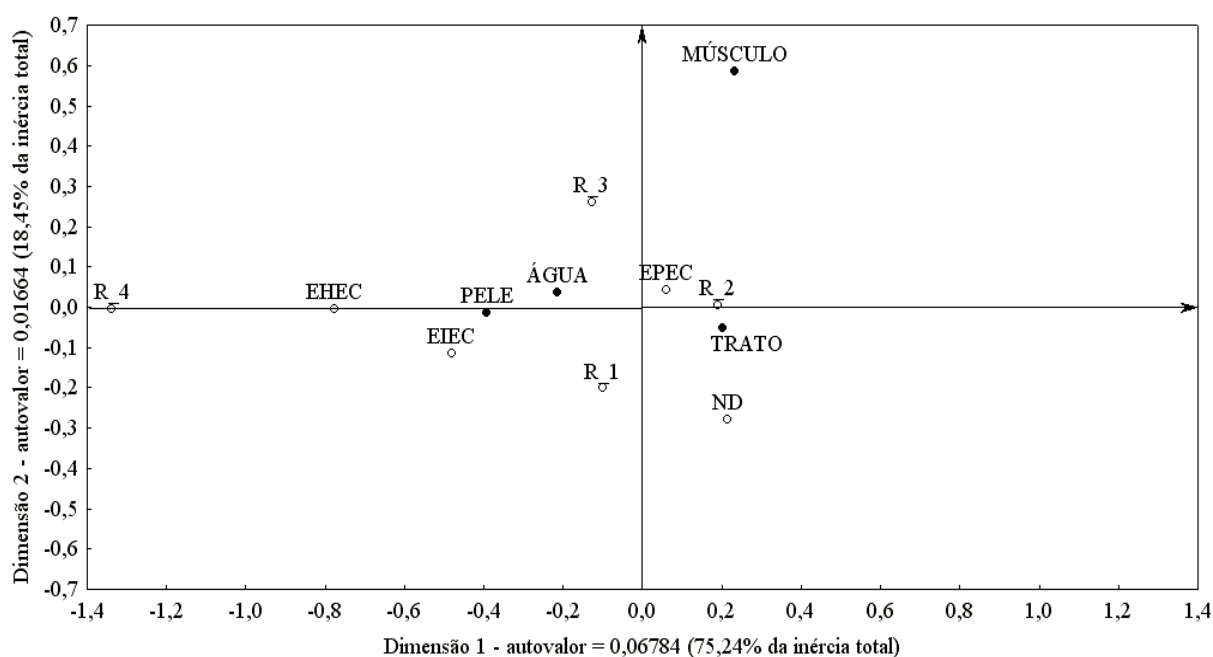


Figura 2. Mapa perceptual resultante da Análise de Correspondência (AC)

A partir da visualização do mapa perceptual foi possível observar que o músculo foi o local de isolamento com menor correlação aos demais fatores. Enquanto água, trato e pele apresentaram correspondência entre si, porém água e pele foram mais correspondentes.

Além disso, os isolados EHEC tiveram maior correspondência a resistência a 4 antimicrobianos (R_4). Os isolados do trato gastrointestinal apresentaram maior correspondência a resistência a 2 antimicrobianos (R_2) e as cepas de *E. coli* isoladas não identificadas sorologicamente apresentaram maior correspondência a resistência a 1 antimicrobiano (R_1) e a 2 antimicrobianos (R_2), semelhante ao sorogrupo EPEC.

6. DISCUSSÃO

Em relação aos sorogrupos EPEC, os resultados foram heterogêneos, sendo O125, O126, O128, O158 e O55 os mais frequentes, e todos estão, comumente, envolvidos em doenças humanas (NATARO e KAPPER, 1998). Contudo, CAMPOS et al. (2004) observaram que os sorogrupos O126 e O128 não apresentaram fatores de virulência em isolados obtidos de crianças com diarreia. Já O55, o segundo mais frequente no trato gastrointestinal, é considerado um dos mais importantes sorogrupos de EPEC, devido sua frequência de isolamento e por ser um dos mais encontrados em diarreias infantis no Brasil (TRABULSI et al., 1996). Estudos baseados nas propriedades de virulência e nas características sorológicas mostraram que sorogrupos EPEC são heterogêneos e, embora a maioria das estirpes pertencentes a estes sorogrupos sejam realmente EPEC, muitos deles não possuem características de virulência (CAMPOS, 1996).

O sorogrupo EHEC apenas não foi encontrado no músculo de peixe. Esse sorogrupo já foi isolado de várias fontes de alimento, porém o bovino é o principal reservatório de O157 (PATON e PATON, 2002). Entretanto, ORSI et al. (2007) encontraram genes de EHEC produtoras de shigatoxinas em águas utilizadas como balneários no Brasil e LICENCE et al. (2001) observaram contaminação da água de abastecimento por O157 na Escócia.

Em relação a *E. coli* enteroinvasora, estudos sobre a presença desse microrganismo no meio ambiente ou alimentos são escassos. Porém, pesquisas sobre sua frequência em casos de diarreia relatam que esse patógeno, geralmente, se encontra em baixas porcentagens. MORENO et al. (2010) observaram a presença de EIEC em 1% dos 290 casos de diarreia infantil em um hospital público de João Pessoa, na Paraíba. Enquanto NGUYEN et al. (2005) encontram EIEC em 7% dos isolados de fezes de crianças com diarreia no Vietnã.

A hemólise é utilizada como indicativo de virulência em microrganismos isolados em animais de consumo humano (COSTA et al., 2006). Porém, nenhum isolado de água e peixe apresentou essa característica.

Pode-se observar que o músculo foi o local de isolamento com menor correspondência em relação aos demais fatores analisados. Esse resultado indica que a avaliação da qualidade higiênico-sanitária do músculo do peixe não representa o real risco da ingestão de peixes oriundos de tanques com presença de patógenos, uma vez que o risco envolvido no consumo de peixe contaminado não está apenas associado com as bactérias presentes nos tecidos comestíveis. A infecção pode ocorrer também durante o manuseio dos peixes e é provável que ocorra a contaminação cruzada para outros alimentos, superfícies de preparo e mãos de manipuladores, quando o peixe é preparado e limpo para consumo (STRAUSS e BLUMENTHAL, 1990). Com base nas análises, água, pele, e trato gastrointestinal de peixe apresentaram maior correspondência e maior quantidade de isolados, sendo possíveis veículos de transmissão de *E. coli* causadoras de diarreia.

Outro aspecto importante a ser considerado, é o fato dos isolados apresentarem alto número de multirresistência. Os isolados EHEC apresentaram maior correspondência à resistência a quatro antimicrobianos. Segundo MORA et al. (2005) cepas EHEC multirresistentes oriundas de alimentos e seres humanos foram isoladas em vários países, principalmente a estreptomicina e tetraciclina. Apesar de alguns estudos mostrarem maior taxa de resistência antimicrobiana entre isolados EHEC de bovinos em comparação com os isolados humanos. SCHROEDER et al. (2002) relatou prevalência de resistência semelhantes entre essas fontes. Apesar de ZIEBELL et al., 2008 relatarem que a resistência antimicrobiana também varia entre as diferentes linhagens.

Os sorogrupos EPEC apresentaram correspondência à resistência a um, dois e três antimicrobianos e EIEC a um e três antimicrobianos. HIEN et al. (2007) observaram que em áreas do Vietnã, onde o uso de águas residuárias é realizado na agricultura e aquicultura, uma em cada três cepas de EIEC isoladas de crianças apresentaram resistência à dezessete antimicrobianos avaliados e EPEC apresentaram resistência à gentamicina, tetraciclina, estreptomicina e trimetropim, dentre outros. NGUYEN et al. (2005) relataram que antimicrobianos apresentam baixa atividade contra cepas de EIEC.

O uso de antibióticos na aquicultura representa risco à saúde pública, pois pode disseminar genes de resistências em microrganismos patogênicos aos seres humanos, como *Aeromonas* spp. e *E. coli*, geralmente presentes na aquicultura (HEUER et al., 2009).

Os antimicrobianos testados representam classes de drogas importantes para a terapêutica na medicina humana e veterinária. A elevada proporção de bactérias resistentes principalmente à eritromicina, à cefalotina e à estreptomicina sugere que outros fatores, além da utilização de antimicrobianos nesses pesque-pagues, favorecem a manutenção de bactérias resistentes no ambiente aquático. Esses fatores podem estar relacionados às práticas inadequadas de manejo nos ambientes aquícolas estudados. Antimicrobianos como eritromicina e estreptomicina são utilizados para tratar e prevenir enfermidades na aquicultura, assim tem-se observado, recentemente, maior frequência no isolamento de bactérias resistentes a essas drogas oriundas dessa atividade (AKINBOWALE et al., 2006).

No presente trabalho o maior número de isolados com características de resistência foram para os antimicrobianos eritromicina e novobiocina. Resultados semelhantes foram obtidos por CARNEIRO et al. (2007) quando estudaram o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas de água e de peixe de tanques de piscicultura. Por outro lado, SATER et al. (2007) encontraram maior resistência à ampicilina e cloranfenicol em *E. coli* isoladas de peixes de viveiros.

Apesar do trato gastrointestinal de peixes apresentar maior número de isolados, a frequência de percentuais de multirresistência foi menor quando comparados aos demais isolados, como também houve maior correspondência entre trato gastrointestinal e resistência a dois antimicrobianos. LIMA et al. (2006) também observaram esse fato e sugeriram que o sistema gastrointestinal de peixes pode não ser a principal fonte de bactérias multirresistentes. Porém, mesmo com menor percentual de MAR em *E. coli* isoladas do trato gastrointestinal de peixes, pode ser possível a troca de resistência entre essas bactérias e aquelas da microbiota do peixe e meio aquático. A transferência de múltipla resistência a antimicrobianos é um dos principais problemas decorrentes do uso de antimicrobianos na aquicultura, visto

que a pressão de seleção favorece as trocas de genes de resistência entre bactérias do ambiente (MIRANDA e ZEMELMAN, 2002).

Em geral, bactérias aquáticas não diferem de outras bactérias quando expostas a agentes antimicrobianos, sendo capazes de transferir genes de resistência antimicrobiana para outras bactérias. Provavelmente, o fato de infecções em peixes e nos seres humanos serem causadas por bactérias pertencentes aos mesmos gêneros, a probabilidade de propagação de resistência à antimicrobianos de bactérias oriundas da aquicultura para o ser humano pode aumentar. Estudos demonstraram que plasmídeos determinantes de resistência são transferidos de agentes patogênicos de peixes e bactérias aquáticas, não só para outras bactérias dentro do mesmo gênero, mas também para *E. coli* (AKINBOWALE et al., 2007).

Portanto, a presença de muitos isolados de *E. coli* resistentes e multirresistentes no ambiente aquícola geram implicações ecológicas e de saúde pública, além de enfatizar a necessidade de novos estudos, principalmente em relação aos determinantes de resistência, assim como sobre a possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos mediante o consumo de pescado (MIRANDA e ZEMELMAN, 2001). De acordo com SAPKOTA et al. (2008) o desenvolvimento de bactérias resistentes à antibióticos no ambiente aquícola pode contribuir ou influenciar a ocorrência dessa característica em bactérias presentes na população humana.

Além disso, o consumo de carnes cruas contaminadas induz a contaminação cruzada e a ingestão de bactérias resistentes a antimicrobianos. Assim, as opções de tratamentos poderão ficar limitadas se estirpes de bactérias multirresistentes a antimicrobianos são transferidas de alimentos contaminadas aos seres humanos (HAMMERUM e HEUER, 2009).

7. CONCLUSÕES

- Vários sorogrupos de *E. coli* enteropatogênicas foram isolados de água e peixe oriundos de pesque-pagues.
- Os isolados de *E. coli* de água e peixe dos pesque-pagues estudados não apresentaram atividade hemolítica.
- Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado.
- Para os antimicrobianos eritromicina e novobiocina foi encontrado o maior número de isolados com perfil de resistência.
- Os isolados do trato gastrointestinal apresentaram menor índice MAR.
- A Análise de Correspondência mostrou que os isolados de *E. coli* da pele, água e trato trato gastrointestinal possuem correspondências entre si.
- Os isolados EHEC apresentaram maior correspondência a resistência a quatro antimicrobianos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos abordam a presença de microrganismos diarreiogênicos nas atividades aquícolas. Além disso, a presença de *Escherichia coli* neste ambiente é avaliada, principalmente, quantitativamente, como indicadora de contaminação fecal em relação a qualidade da água de cultivo, esquecendo que mesmo em baixas concentrações a presença desse microrganismo indica risco de transmissão de patógeno aos seres humanos.

É necessário enfatizar que os agentes patogênicos transmitidos pelo peixe ao ser humano, frequentemente, não causam prejuízos na produção aquícola. Portanto, o produtor não se sente estimulado a buscar controle sanitário adequado para assegurar a qualidade do produto. Entretanto, o peixe contaminado, quando consumido, pode servir de via de transmissão desses agentes para o ser humano bem como contaminar outros alimentos e superfícies.

Faz-se necessária também a conscientização dos produtores e empresários desta atividade em relação a existência de contaminação de origem fecal, incluindo-se a presença de enteropatógenos, pois a manutenção desta forma de produção pode trazer prejuízos ao consumidor. Visto que a presença de um alto número de isolados EPEC nesse estudo possivelmente indica contaminação por enteropatógenos advindos de excretas humanas e/ou animais, representando risco à saúde dos consumidores, principalmente aos mais suscetíveis como crianças, idosos e adultos imunodepressivos.

Diante do exposto, pode-se observar que o consumo do pescado adequadamente preparado e cozido, a educação dos consumidores e produtores sobre os fatores de contaminação cruzada, a conscientização da população no consumo inadequado de peixes crus e outras medidas no preparo podem reduzir alguns problemas relacionados ao consumo de peixes oriundos de pesque-pagues.

Outro fator preocupante é o uso indiscriminado de antimicrobianos nestas atividades, pois a ocorrência de bactérias multirresistentes nestes ambientes pode ser um risco à saúde pública. Uma vez que o uso desses agentes em um nicho

ecológico, como na aquicultura, pode gerar a ocorrência de resistência em outros nichos ecológicos, incluindo o ambiente humano.

Do ponto de vista da saúde pública, torna-se importante e necessária uma campanha educacional dirigida aos produtores e frequentadores de pesque-pagues para conscientização sobre a boa prática de manejo nestes ambientes, principalmente relacionada à existência de outros animais próximos aos tanques de cultivo, às medidas profiláticas incorretas, à alimentação imprópria dos peixes, à utilização de iscas inadequadas e às condições da água utilizada para abastecimento dos tanques.

Além disso, pesquisas capazes de identificar a presença de enterotoxinas devem ser realizadas com intuito de determinar se os microrganismos isolados destas atividades são realmente produtores dessas toxinas capazes de causar intoxicações alimentares nos consumidores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal Applied in Microbiology**, v.100, n.5, p.1103–1113, 2006.

AKINBOWALE O. L.; PENG, H.; BARTON M. D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. **Journal Applied in Microbiology**, v.103, n.5, p.2016–2025, 2007.

ALEXANDRINO, A. C. Prevenção de doenças em piscicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, n.23, p.45, 1998.

AMINOV, R. I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R. I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation o primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribossomal protection proteins. **Applied Environment Microbiology**, v.67, n.1, p.22-32, 2001.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4^aed, 2001. 676 p.

BARROS, G. C. Perda da qualidade do pescado, deterioração e putrefação. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.30, p.59-64, 2003.

BARZA, M.; TRAVERS K. Excess infections due to antimicrobial resistance: the “Attributable fraction”. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n.3, p. 126–130, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v 45, n.4, p.493-496, 1996.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesion mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strains 2787 (O126:H27). **Infectious Immunology**, v.60, n.1, p.13-18, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; BOUGUÉNEC, C. L. Identification of an Aggregative adhesion Fimbria (AAF) type III-encoding Operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detection the AAF-encoding operon family. **Infectious Immunology**, v.70, n.8, p.4302-4311, 2002.

BILGE, S. S.; CLUSEN, C.; LAW, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesion mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.8, p.4281-4289, 1989.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.6, p.545-552, 2004.

CAMPOS, L. C. Conventional methods for the diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Brazilian Journal Microbiology**, v.27, n.1, p.50-53, 1996.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C.; PEREIRA-JÚNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.869-876, 2007.

CARMO, G. M.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECM, C. P.; SANTOS, D. A. dos; ALMEIDA, M. G. de; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.6, n.5, p.1-7, 2005.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* — an emerging problem? **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.41, n.3, p.93–98, 2001.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.365–378, 2003.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.4, p.535–549, 2007.

DALTON, C. B.; GREGORY, J.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J.; GIVNEY, R.; KRAA, E.; GOULD, D. Food disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. **Community Diseases Intel**, v.2, n.28, p.211-214, 2004.

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

DIAZ, J. H. Is fish consumption safe? **Journal of the Louisiana State Medical Society**, v.156, n.1, p.42-49, 2004.

ELER, M. N.; CECCARELLI, P. S.; BUFON, A. G. M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Mortandade de peixes (matrinxã, *Brycon cephalus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*) associada a uma floração de cianobactérias em pesqu e pague, município de Descalvado, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, v.14, p.35-45, 2001.

ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L.; ESPÍNDOLA, E. A.; BRIGANTE, J.; NOGUEIRA, M. M.; MENEZES, A.; MILANIN, T. J. Avaliação da qualidade da água e sedimento dos pesque-pague: Análises físicas, químicas biológicas e bioensaios de toxicidade. In: ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. A. **Avaliação dos impactos de pesque-pague: Uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima. 2006, p.101-144.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699e00.htm>>. Acesso em: 26 out. 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo. 2002. 182 p.

GARCIA-ALJARO, C.; MUNIESA, M.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; JOFRE, J.; BLANCH, A. R. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **Fems Microbiology Letters**. v.246, n.1, p. 55-65, 2005.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. p 204-208.

GILLIGAN, P. H. *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clinics in Laboratory Medicine**, v 19, n.3, p.505-521, 1999.

GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. D. L. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v.38, n.9, p.2368-2374, 2004.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise Multivariada de dados**. Porto Alegre. RS, 5ª ed., 2005.

HALL, G.; KIRK, M. D.; BECKER, N.; GREGORY, J. E.; UNICOMB, L.; MILLARD, G.; STAFFORD, R.; LALOR, K.; OZFOONET WORKING GROUP. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.11, p.1257-1264, 2005.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, n.7, p.916–921, 2009.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, n.1, p.12–18, 2006.

HEUER, O. E.; KRUSE, A. H.; GRAVE, B. K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ANGULO, F. J. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Food Safety**, v.49, n.88, p.1248-1253, 2009.

HIEN, B. T. T.; TRANG, D. T.; SCHEUTZ, F.; CAM, P. D.; MØLBAK, K.; DALSGAARD, A. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and other causes of childhood diarrhoea: a case–control study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, n.3, p.1086-1096, 2007.

HINSON, G.; WILLIAMS, P. H. Adesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: HOPWOOD, D. A.; CHARTER, K. **Genetics of bacterial Diversity**, cap. 14, p. 287-307, Academic Press limited, London, UK., 1989.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. **Pediatric Infectious Diseases**, v.15, n.4, p.266-271, 2004.

HUBER I., SPANGGAARD B., APPEL K. F., ROSSEN L., NIELSENAND T.; GRAM L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal Applied Microbiology**, v.96, n.1, p.117-132, 2004.

JALLAT, C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. Survey of isolates of diarrhoeagenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *Escherichia coli* strains with multiple adhesive factors. **Research in Microbiology**, v.145, n.8, p.621-632, 1994.

JOHNSON, J. R; STELL, A. L. Extend virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with uropis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal Infectious Diseases**, v.181, p.261-272, 2000.

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>. Acesso em: 27 de dezembro de 2009.

KHACHATRYAN, A. R.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. **Applied Environment Microbiology**, v.70, n.2, p.752-757, 2004.

KAPER, J. B.; NATARO, J. D.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Natural Review**, v.2, n.2, p.123-139, 2004.

KOBAYASHI, R. K. T.; SARIDAKIS, M. O.; DIASA, A. M. G.; VIDOTTO, M. C. Molecular identification of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, n.4, p.275-280, 2000.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN J. W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 177-261, 2001.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environment Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.107-117. 2000.

LICENCE, K.; OATES, K.R.; SYNGE, B.A.; REID, T.M. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiology and Infection**, v.126, n.1, p.135-138, 2001.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICOLLI, R. H.; BUENO-FILHO, J. S.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Agrotécnica**, v.30, n.1, p.126-132, 2006.

LOPES, R. B. **Caracterização dos lagos de pesca esportiva frente à qualidade de água e ao manejo empregado**. 2000. Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira. 2000.

LOPES R.B.; LANDELL-FILHO, L. de C.; DIAS, C.T. dos S. Fee-fishing operation evaluation at northwest São Paulo state, Brazil. **Scientia Agricola**, v.62, n.6, p.590-596, 2005.

MANNING, S. D.; MOTIWALA, A. S.; SPRINGMAN, A. C.; QI, W.; LACHER, D. W.; OUELLETTE, L. M.; MLADONICKY, J. M.; SOMSEL, P.; RUDRIK, J. T.; DIETRICH, S. E.; ZHANG, W.; SWAMINATHAN, B.; ALLAND, D.; WHITTAM, T. S. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. **PNAS**, v.105, n.12, p.4868-4873, 2008.

MATTÉ, M. H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M. L.; MALUCELLI, M. I. C.; NITRINI, S. M. O.; MATTÉ, G. R. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control**, v.18, n.6, p.747-751, 2007.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ed. Washington, APHA, 2001. p. 331-341.

MERCANTE, C. T. J.; CABIANCA, M. A.; SILVA, D.; COSTA, S. V.; ESTEVES, K. E. Water quality in fee-fishing ponds located in the São Paulo metropolitan region, Brazil: analysis of the eutrophication process. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16, n.1, p.95- 102, 2004.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, n.11, p.1096-1102, 2001.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, v.212, n.1, p.31-47, 2002.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of

Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v.156, n.1, p.793-806, 2005.

MÖLLERKE, R. O.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Colimétrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p.102-106, 2002.

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

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

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

MURATORI, M. C. S.; COSTA, A. P. R.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, P. C.; PODESTÁ-JUNIOR, R. L. de. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v.8, n.116-117, p.50-54, 2004.

NAKANISHI, N.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; HAYASHI, T.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.155, n.2, p.521–530, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; BROWNE, R. R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v.6, n.9, p.829-831, 1987.

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

NAYLOR, R. L.; HARDY, R. W.; BUREAU, D. P.; CHIU, A.; ELLIOTT, M.; FARRELLE, A. P.; FORSTER, I.; GATLIN, D. M.; GOLDBURG, R. J.; HUA, K.; NICHOLS, P. D. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **PNAS**, v.106, n.36, p.15103-15110, 2009.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, 8^o ed., v.23, n.1, 2003.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S., TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.1, p.597–603, 2006.

NGUYEN, T. V.; LE, P. V.; LE, C. H.; WEINTRAUB, A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.2, p.816–819, 2005.

NOWICKI, B.; SELVARANGAN. R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesions: decayaccelerating factor receptor recognition and invasiveness. **Journal Infectious Diseases**, v.183, n.1, p.524-527, 2001.

OKEKE, I.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, n.5, p.304-313, 2001

OLSEN, S. J.; MACKINNON, L. C.; GOOLDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1993-1997. **CDC Surveillance Summaries**, v.1, n.49, p.61-62, 2000.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; GOMES, T. A. T.; PRADO, D. P. I.; GILSON, P. M.; OTTOBONI, L. M. M. Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs. **Research in Microbiology**, v.158, n.5, p.420-427, 2007.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, 2007. 279p.

PACHECO, T. A.; LEITE, K. G. M.; ALMEIDA, A. C.; SILVA, N. M. O.; FIORINI, J. E. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p.68-72, 2004.

PAL D.; DASGUPTA, C. H. Microbial pollution in water and its effect on fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.4, n.1, p.32–39, 1992.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Reactivity of Convalescent-Phase Hemolytic-Uremic Syndrome Patient Sera with the Megaplasmid-Encoded TagA Protein of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1395–1399, 2002.

PENG, J.; YANG, J.; JIN, Q. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.1, p.147-152. 2009.

PEZZATO, L. E.; SCORVO FILHO, O. J. D. Situação atual da aquicultura na região sudeste. In: **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000, p. 303-323.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. **Natural Review Microbiology**, v.4, n.8, p.629-635, 2006.

PIMENTEL, L. P. S.; PANETTA, J. C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação do pescado comercializado na grande São Paulo. Parte 1 -Resultados Microbiológicos. **Higiene Alimentar**, v.17, n.106, p.56-63, 2003.

RANGEL, P. M. **Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SANTIAGO, F. E.; THOMAS, S. W.; CYNTHYA, L. W.; MARGARET, A. R.; RICHARD, E. L. Genomic Divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates, Valencia, Spain. **International Microbiology**, v. 8, n.4, p. 271-278, 2005.

SANTOS, T. M. dos. **Avaliação Bacteriológica e Físico-Química (pH e N-BVT) da Carne de Piraçutaba, *Brachyplatistoma vaillanti* (Siluriformes, Pimelodidae), Congelada Comercializada em Belo Horizonte – MG**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, n.8, p.1215–1226, 2008.

SARTER, S.; NGUYEN, H.N.K.; HUNG, L.T.; LAZARD, J.; MONTET, D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. **Food Control**, v.18, n.11, p.1391-1396, 2007.

SCHROEDER, C. M.; ZHAO, C.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D. D.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; MENG, J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.576–581, 2002.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxin mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v.60, n.1, p.167-215, 1996.

SERVIN A. A. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.18, p.264-292, 2005.

SHAW, R. K.; CLEARY, J.; MURPHY, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p.1243–51, 2005.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Brasília: Merck. p.73-116, 1995.

SONODA, D. Y. **Análise econômica de sistemas alternativos de produção de tilápias em tanques-rede para diferentes mercados**. Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

STRAUSS, M.; BLUMENTHAL, U.J. **Human waste use in agriculture and aquaculture —utilization practices and health perspectives**. International Reference Centre for Waste Disposal, Duebendorf, Switzerland, p. 34–36, 1990.

TADDEI, C. R.; MORENO, A. C. R.; FILHO, A. F.; MONTENOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiology Letters**, v.227, n.2, p.249-253, 2003.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaça de frango industrialmente processados. **Higiene Alimentar**, v.17, n.107, p.52-55, 2003.

TIRADO, C.; SCHIMIDT, K. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxication in Europe, 7° Report, 1993-1998. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_fr.htm. Acesso em 02 out. 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3ª. ed., Editora Atheneu, Rio de Janeiro, p.586, 2002.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T. S.; GOMES, T. A. T.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A. G. Traditional and non - traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 27, n.1, p.1-6, 1996.

TRAN VAN NHIEU, G.; BOURDET-SICARD, R.; DUMENIL, G.; BLOCKER, A.; SANSONETTI, P. J. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. **Cell of Microbiology**, v.2, n.3, p.187-193, 2000.

UNGAR, M. K., GERMMANO, M. I. S., GERMANO, P. M. L. Riscos e Conseqüências da Manipulação de Alimentos para a Saúde Pública. **Higiene Alimentar**, v.6, n.21, p.14-16, 1992.

VICENTE, L. C. P.; TEIXEIRA, L. M. F. NIGUEZ-ROJAS, L.; LUNA, M. G.; SILVA, L. ANDRADE, J. R. C.; GUTH, B. E. C. Outbreaks of cholera-like diarrhea caused by

enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.9, p.669-674, 2005.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETOS, N. S. E.; SOUZA, O. V.; TÔRRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. 380p.

WANI, S. A.; HUSSAIN, I.; NABI, A.; FAYAZ, I.; NISHIKAWA, Y. Variants of eae and stx genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxinproducing *Escherichia coli* from calves. **Letters in Applied Microbiology**, v.161, n.6, p.145–148. 2007.

WHO. World Health Organization. Water, sanitation and hygiene links to health. 2004. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/en/index.html.

Acesso em 28 out 2009.

WHO. World Health Organization. Availability and consumption of fish. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/foodconsumption/en/index.html> Acesso em 27 out 2009a.

WHO. World Health Organization. Food Safety and Foodborne Illness. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs37/en/index.html>. Acesso em 27 out 2009b.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infectious Immunology**, v.64, n.4, p.1441-1445, 1996.

ZIEBELL, K.; STEELE, M.; ZHANG, Y.; BENSON, A.; TABOADA, E. N.; LAING, C.; MCEWEN, S.; CIEBIN, B.; JOHNSON, R.; GANNON, V. Genotypic characterization and prevalence of virulence factors among Canadian *Escherichia coli* O157:H7 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.14, p.4314–4323, 2008.