

TITULO

Deteção e caracterização dos fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de água de consumo humano no estado do Maranhão.

AUTORES: Márcia Araújo van der Boor, Júlio César Reis da Silva, Raimundo Rodrigues dos Santos Filho, Helenice Araújo Costa, Patrícia de Maria Silva Figueirêdo, Valério Monteiro Neto

ABSTRACT

Detection and characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from water used for human consumption in the state of Maranhão, Brazil.

Escherichia coli is naturally found in both the human as well as many animal intestinal tracks. However, there are strains of *E. Coli* that can provoke diseases in both humans and animals. An estimated 88% of all human diarrheic illnesses in the world are caused by the consumption of contaminated water.

The objective of this research is to detect and characterize the virulence factors of *E. coli* found in water used for human consumption in municipalities and indigenous villages in the interior of the state of Maranhão.

The detection of *E. coli* and the coliform count were performed using the Chromogenic Subtraction method. Afterwards hemolytic (hemolysin) and enzymatic (lipase) activity tests, biofilm production tests and tests to measure antimicrobial sensibility were performed. Of the 75 samples that were tested, 57 (76%) were positive for lipolysis, 62 (82%) for haemolysis in sheep's blood, and 38 (51%) for the production of biofilm. The most resistant antibiotics were AMP (with 65% resistance) and the highest sensibility rates were found in IPM and CIPRO (both 100%).

PALAVRA-CHAVE: E. coli, água, virulência.

1. Introdução

A água é um dos elementos de maior importância para todas as formas de vida na Terra. Ela está presente em todos os organismos vivos; transportando diversos compostos nutritivos e exercendo funções imprescindíveis principalmente para a bioquímica celular e fisiologia humana. No meio ambiente, ajuda a controlar a temperatura de nossa atmosfera e apresenta uma série de funções de extremo valor (MENDONÇA, 2003).

O Brasil pode ser considerado um país privilegiado, com 13% de toda água doce do planeta, perfazendo 5,4 trilhões de metros cúbicos. No entanto, é desigualmente distribuída: 70% na região amazônica, 15% no Centro-Oeste, 6% no Sul e no Sudeste e 3% no Nordeste. Apesar da abundância, o recurso não tem sido bem utilizado, pois 46% dela são desperdiçados, o que daria para abastecer toda a França, a Bélgica, a Suíça e o Norte da Itália. É urgente, portanto, um novo padrão cultural (BOFF, 2003).

Confirmando as tendências de escassez de água como uma futura preocupação mundial, informações divulgadas pelo Fórum Mundial de Água em Haia (Holanda), diz que três bilhões de pessoas no mundo vivem em péssimas condições sanitárias, sendo que um milhão não tem acesso nenhum à água potável. Infelizmente, os dados não refletem políticas públicas de saneamento e abastecimento, o enfoque dado é na tentativa de conscientizar as pessoas que a água é um bem finito e que milhares já estão sofrendo com a falta de abastecimento, razão que durante todo Fórum, o tradicional símbolo químico conhecido por H₂O foi chamado de *The blue gold* - O ouro azul (HOEKSTRA & HUNG, 2002)

As tecnologias de tratamento de água evoluíram consideravelmente, podendo-se dizer que qualquer água pode ser tratada e destinada ao consumo, embora os custos e os riscos envolvidos possam ser extremamente elevados. Somente um estudo detalhado da qualidade da água bruta e, na maioria das vezes, a execução de ensaios em instalações piloto, podem fornecer os elementos necessários para a definição da tecnologia de tratamento apropriada à qualidade de água bruta em questão, com o fim de torná-la potável

Justamente por ser um líquido vital e amplamente consumido, a água destinada ao consumo humano deve ser analisada criteriosamente e de modo periódico, já que sua contaminação por excretos de origem humana, ou animal, pode torná-la um veículo de transmissão de agentes de doenças infecciosas e parasitárias (FERNANDES et al, 2001). Essa água ainda pode ser maléfica pela eventual presença de substâncias químicas nocivas como certos metais ou pesticidas (OPAS, 2001). Sua adequada potabilidade minimiza contaminações cruzadas e, portanto previne surtos de infecção e intoxicações, durante o abastecimento e consumo (MARTINS et al., 2001).

A saúde pública requer água potável segura, o que significa que ela deve estar livre de bactérias patogênicas. Entre os patógenos disseminados em fontes de água, as enterobactérias são as mais frequentemente encontradas. Como consequência, fontes de contaminação fecal em água devido à atividade humana devem ser estritamente controladas (OLIVEIRA & TERRE, 2004). Este controle é feito medindo-se alguns parâmetros como presença e níveis de coliformes fecais e totais. O uso do grupo coliforme como um indicador de possível presença de patógenos entéricos em sistemas aquáticos tem sido sujeito de debates por muitos anos. Muitos autores reportam surtos de doenças ligadas à água em casos de variação dos coliformes (OLIVEIRA & TERRE 2004).

No Brasil, as normas referentes à qualidade microbiológica das águas são definidas pela portaria número 518 (23/03/2004) – Ministério da Saúde, capítulo IV – padrão de potabilidade. Esta define que a água para o consumo humano deve ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes com ausência em 100 mL ou positividade de até 5% para coliformes totais (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 1986; BRASIL, 2000).

Geralmente, na determinação de coliformes, realiza-se a diferenciação entre os de origem fecal e não-fecal. Os coliformes não-fecais como a *Serratia* e *Aeromonas* (SILVA & JUNQUEIRA, 1995), são encontradas no solo e vegetais, possuindo a capacidade de se multiplicarem na água com relativa facilidade. No entanto os coliformes de origem fecal, não se multiplicam facilmente no ambiente externo e são capazes de sobreviver de modo semelhante às bactérias patogênicas (GIOMBELLI et al., 1998).

O *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* define o grupo coliforme como: "todas as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram negativas, não esporuladas e na forma de bastonete", as quais fermentam a lactose com formação de gás dentro de

48h a 35°C. Neste grupo incluem-se organismos que diferem nas características bioquímicas, sorológicas e no seu habitat. Podem ser classificadas em: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiela* e outros gêneros que quase nunca aparecem em fezes como a *Serratia*.² A monitoração das condições sanitárias de águas para consumo é realizada através de análises das bactérias do grupo coliforme, que atuam principalmente como indicadores de poluição fecal, pois ocorrem na flora intestinal do homem e de animais de sangue quente (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985).

Escherichia coli faz parte da flora normal do trato-intestinal do homem (e outros animais) e tem um papel importante no organismo, controlando a multiplicação de bactérias patogênicas e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Contudo, existem cepas de *E. coli*, capazes de provocar doenças (intestinais e extra-intestinais) em humanos e outros animais, sendo estas chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (HAMELIN et al, 2007, VALENTINI et al, 1992). Esta bactéria usualmente coloniza o tubo digestivo algumas horas após o nascimento, estabelecendo-se principalmente no cólon e na parte mais distal do íleo, onde normalmente permanece confinado ao lúmen (ACHTMAN e PLUSCHKE, 1986). Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes de doenças de origem alimentar (OLSEN et al., 2000). As linhagens de *E. coli* patogênicas causadoras de infecções entéricas no ser humano e nos animais envolvem seis categorias: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Dentre estas categorias, as STEC destacam-se devido ao seu potencial zoonótico emergente (KONEMAN et al., 2001).

***Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC)**

A EPEC tem como seu principal reservatório o homem, é difícil ter a presença em animais, e quando presente, os sorotipos identificados não correspondem com a de humanos. (KUHRNERT et AL., 2000). A transmissão da bactéria e pela água e alimentos contaminados que se aloja no intestino delgado com a adesão firmemente as vilosidade das células epiteliais intestinal causa uma lesão típica, denominada lesão "attacheng/effacing A/E. o principal aspecto desta lesão é o desarranjo do cito esqueleto e a cumulo de actino polimerizando logo abaixo do local de adesão, tendo a destruição da bordas das vilosidade e a formação de um estrutura do tipo pedestal no topo da vilosidade, onde a bactéria se liga e permanece em intimo contato a celular. EPEC não invade a mucosa intestinal e não produz toxina (TRABULSI et AL., 2002).

***Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

É mais comum o aparecimento de diarreia em criança nos países de subdesenvolvimento e em viajante desta área é conhecido como diarreia do viajante é uma doença aguda com sintomas consistidos de fezes líquidas, náusea, vomito e cólicas abdominais. (SVENNERHOLM, 1996; KUHRNERT et al., 2000).

O que caracteriza o mecanismo central de virulência e a produção de toxina termolabil ou termoestável. No organismo do hospedeiro colonizam a superfície da mucosa intestinal e, pela ação de toxina, causa diarreias aquosa (NATARO; KAPER, 1998).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

São causas de diarreias persistentes em crianças e adultas tanto em países desenvolvidos como desenvolvido. Embora ainda não totalmente elucidado o mecanismo de patogenicidade das EAEC mais se sabe que forma uma colonização bacteriana no epitélio intestinal, com conseqüentes aumentos da produção de mucosa causando danos ao epitélio intestinal a causa desta infecção são provavelmente mediante por toxina que parece conter um forte efeito agregativo com as adesinas AAFs, facilitando a multiplicação e penetração através da mucosa (KAPER et al 2004).

***Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)**

Tem sido causa de diarreias e a sua patogenicidade e muita semelhante a da bactéria *shigella* spp, por sua invasão ao epitélio do colon sendo que ambas podem elaborar uma ou mais enterotoxinas que são capazes de causar uma infecção severa a reação inflamatória intensa com presença ulcerações do epitélio intestinal (NATARO; KAPER, 1998).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Ocasional diarreia hemorrágica (colite hemorrágico HC) e a síndrome hemolítica uremico (SHU) são bactérias produtora de citotoxina semelhante a toxina de shiga que ocasionam lesões celulares por afetarem a síntese protéica. Dentro deste patótipo se destaca subgrupo das EHEC (NATARO; KAPER, 1998).

As EHEC são encontradas nas fezes da maioria dos animais domésticos. Mas a infecção humana o reservatório mais importante e o gado bovino aparentemente saudável podendo ser caracterizado como agente zoonótico. (NATARO; KAPER, 1998).

Entre os fatores envolvidos na sua patogenicidade podemos citar várias citotoxinas, hemolisinas, hemaglutininas e enzimas que favorecem o aparecimento de diarreia. A diarreia infecciosa é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade infantis nos países em desenvolvimento (principalmente em crianças pertencentes a famílias de baixo nível sócio-econômico) e é um dos indicadores utilizados na avaliação do nível de saúde de uma população (HANSON, 1993; NATARO *et al.*, 1998; KOSEK *et al.*, 2003).

Desde os primórdios da microbiologia, tem sido estabelecido que a água de consumo humano é responsável pela veiculação de diversos patógenos causadores de doenças diarreicas e outras (ASHBOLT, 2004). Estima-se que 88% das doenças diarreicas do mundo é causada pelo consumo de água contaminada (WHO, 2003). O tratamento adequado da água consumida pela população é essencial para evitar que a mesma se contamine com microorganismos patogênicos contidos na água. (ASHBOLT, 2004, DAWSON *et al.*, 2000).

A presença de *E. coli* na água constitui uma grande preocupação para saúde pública, uma vez que a transmissão de fatores de virulência entre cepas de *E. coli* contribui para sua patogenicidade e aumento de sua diversidade no ambiente (DONNENBERG e WHITTHAN., 2001). As fontes de água são consideradas reservatórios potenciais de *E. coli* (GARCÍA – ALJARO *et al.*, 2000).

Os fatores de virulência podem permitir a colonização das superfícies da mucosa, a lesão e invasão dos tecidos, superação dos mecanismos de defesa e incitação da resposta inflamatória, podendo ser utilizado pelo micro-organismo em diferentes combinações, com diferentes caminhos moleculares, sendo que em alguns casos é possível fazer a diferenciação destes organismos através dos sintomas da doença (KAPER *et al.*, 2004). A habilidade da *E. coli* em ser patogênica é devido a expressão de seus fatores de virulência, onde seus genes estão localizados em cromossomo e/ou plasmídios, alguns estão mais envolvidos com a colonização, como as adesinas e invasinas, e outros com as lesões ao hospedeiro, toxinas (NATARO *et al.*, 1998).

A *E. coli* pode ser encontrada em diferentes nichos ecológicos encontrando diversas situações de estresse devido ao uso de antibióticos, o que lhe proporciona a aquisição e disseminação de genes que lhes conferem a resistência a esses agentes (SÁENZ, 2004). Dentre os mais variados mecanismos de resistência aos antibióticos, se destaca a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), designadas como enzimas (do grupo das β lactamases) mediadas por plasmídeos, que apresentam a capacidade de hidrolisar e inativar uma grande variedade de antibióticos do grupo β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração, penicilinas e aztreonam (NATHISUWAN; BURGESS; LEWIS, 2001). Vale ressaltar que, os antibióticos β -lactâmicos constituem o tipo de tratamento mais comum para infecções bacterianas (KOTRA; SAMAMA; MOBASHERY, 2002).

De um modo geral, a resistência bacteriana aos antibióticos pode dar-se de três formas diferentes: quando há uma mudança na permeabilidade da membrana celular que, posteriormente, impedirá a entrada do antibiótico na célula ou fará com que ele seja bombeado para o exterior da célula; quando as bactérias alcançam a capacidade de degradar ou então, inativar o antibiótico e, finalmente também podem criar resistência quando adquirirem uma mutação que altera o alvo do antibiótico de modo a que esse alvo não seja afetado.

O crescimento do biofilme está associado ao aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e à susceptibilidade a estes agentes são mil vezes maiores em culturas planctônicas (SMITH, 2005) Estudos sugerem que a resistência do biofilme é explicada pela impenetrabilidade dos agentes antimicrobianos devido à presença de um polímero hidrofílico que reveste o biofilme e a estratégias de liberação dos agentes antimicrobianos (SMITH, 2005).

Quanto à produção de hemolisina, vários estudos concluíram que isolados que apresentavam a capacidade de produção desta toxina sendo mais virulentas do que os isolados não-hemolíticos (COOKSON *et al.*, 2007; HUNT *et al.*, 2008).

Hemolisina é uma proteína com atividade citolítica que causa a lise, preferencialmente, de eritrócitos. Esta proteína é importante para obtenção de ferro e assim favorecer o crescimento bacteriano. Alguns isolados de *E. coli* são capazes de produzir simultaneamente vários tipos de hemolisinas (FIGUEIREDO, CATANI, YANO, 2003; HUNT *et al.*, 2008).

Segundo Apoitia *et al.* (2004) 15% das águas subterrâneas de Cuiabá (BR) estão contaminadas com *E. coli*. Higgins *et al.* (2005) identificaram a presença de cepas de *E. coli* *tir* e *stx* positivas isoladas de água da região metropolitana de Baltimore (EUA), Conte *et al.* (2003) fizeram a avaliação microbiológica das águas com e sem tratamento da região nordeste do estado de Rio de Janeiro (BR), e relataram que 25% de todas amostras analisadas estavam contaminadas com *E. coli*.

O controle microbiológico da água fornecida à população ser intimamente ligado com a prevenção de doenças de veiculação hídrica (Lislie *et al.*, 1999). Saber a qualidade da água utilizada é essencial independentemente da sua finalidade, seja para consumo humano, limpeza, uso em irrigação ou em projetos de agricultura, dispor de água potável é questão de segurança e de saúde pública (RIBEIRO, 2006). Este estudo se faz necessário pelo fato de existirem poucos relatos, especialmente em nossa região, sobre microorganismos isolados de água de consumo humano e identificação e caracterização de seus fatores de virulência.

2. OBJETIVO

Deteção e caracterização dos fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de água de consumo em municípios e aldeias indígenas do Maranhão.

2.1 Objetivo Específicos

- Obtenção de isolados de cepas de *E. coli* provenientes de água de consumo.
- Deteção de atividade hemolítica e enzimática (lipase) das cepas de *E. coli*.
- Produção de biofilme das EEC isoladas de água.
- Padrão de resistência e sensibilidade frente à antibióticos.

3. Metodologia

3.1. Isolamento e Identificação.

A deteção de coliformes totais e *E. coli* foi realizada utilizando-se o método do Substrato Cromogênico, seguindo as especificações do fabricante, aprovado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association, 2004) e pela Portaria do Ministério da Saúde nº. 518 (BRASIL, 2004).

As amostras foram fornecidas pelo LACEN (Laboratório Central do Estado) e pela FUNASA (Unidade Regional de Controle de Qualidade de Água).

Em seguida as amostras positivas para *E. coli* no Colilert foram semeadas com alça de platina em anel em estrias pelo método do esgotamento em Ágar Mackonkey e encubadas à 37° C por 24h. Em seguida as colônias suspeitas de serem *E. coli* foram semeadas no kit de identificação de enterobactérias EPM, MILI, CITRATO. Das amostras devidamente identificadas como *E. coli*, a partir do meio EPM foi feito o semeio em BHI com glicerol e encubado à 37°C por 24h para obtenção do estoque congelado das cepas.

3.2. Testes de atividade hemolítica (hemolisina) e enzimática (lipase)

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em 3mL de caldo BHI durante 24h, a 37°C. Após esse período, as amostras foram semeadas por picada em placas de ágar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e 48 horas e observou-se os halos de hemólise total produzidos pela alfa hemolisina (Hly) (ANDREU *et al.*, 1997). Para detecção de lipase as amostras foram semeadas em placa de ágar Mullen Hinton com adição de azeite à 2%. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e 48 horas e observou-se os halos de atividade lipolítica (lipólise) e atividade hemolítica (hemólise) ao redor das colônias.

3.3. Produção de biofilme

Para detecção da capacidade dos isolados de produzir biofilme em meio sólido foi utilizado Ágar Vermelho Congo (CRA). O meio de cultura foi preparado a partir dos seguintes compostos: Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid) 37g/L, Sacarose (Difco) 50 g/L, Ágar Base (Difco) 15 g/L e Ágar Vermelho Congo (CRA) 0,8g/L. Onde, o Ágar Vermelho Congo (CRA) foi autoclavado separadamente, em solução aquosa hiperconcentrada, e adicionado aos demais constituintes do meio.

Após o preparo, dividiu-se o Ágar Vermelho Congo (CRA) em placas de Petri, e após foi feito a semeadura. As placas foram inoculadas em estufa microbiológica por 24 – 48 horas a 37°C. Em 24 horas foram verificados o crescimento de colônias e a produção de biofilme. Para as amostras que apresentaram colônias de coloração negra ou enegrecida considerou-se como produtoras de biofilme, e às que apresentaram colônias de coloração vermelha como não produtoras de biofilme. (FREEMAN, FALKINER, KEANE, 1989)

3.3 Padrão de resistência frente aos antibióticos.

O antibiograma foi realizado com base no método de difusão em disco em ágar Mueller-Hinton. O inóculo foi distribuído através da varredura utilizando swab na superfície do ágar Mueller-Hinton. Os discos com antibióticos foram distribuídos nas placas de forma a manter uma distância de aproximadamente 24 mm entre eles, para não comprometer o resultado analítico das amostras. Todos os microorganismos foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: CRO= ceftriaxona TZP=Tazobactan, AMP=ampicilina, IPM= Imipenem SXT= Sufametoxazol – Trimetoprim CXM= Cefuroxina - Sodiú SAM= Ampicilina – Sulbactam CN= gentamicina, CIP= ciprofloxacino, AML= amoxicilina + ácido clavulânico ATM= aztreonam, O material foi incubado em estufa bacteriológica a 36,5°C por 24 horas. Após realizavam-se a análise através da medida dos halos de inibição do microorganismo frente à droga testada segundo as orientações do National Comittee for Clinical Laboratory Standards.

4. DESCOBERTAS E DISCUSSÕES.

E. coli é um dos microrganismos utilizados como parâmetro de controle da qualidade da água para consumo, tendo em vista que é considerado um indicador de contaminação fecal e também devido a todas as implicações que a presença desse microrganismo pode causar à saúde do homem (FARNLEITNER *et al.*, 2000). A portaria 518/2004 do Ministério da Saúde define que a água para o consumo humano deve ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes com ausência em 100 mL ou positividade de até 5% para coliformes totais (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 1986; BRASIL, 2000).

A produção de hemolisinas pelas bactérias é um fator de virulência importante, pelo fato de sua presença em cepas de *E. coli* causarem danos em tecidos, por ser uma citotoxina, e permitir a

sua penetração em camadas de tecidos e subsequente invasão do hospedeiro, além de facilitar a obtenção de ferro através da lise das hemácias (Beutin, 1990).

Nos nossos estudos obtivemos como resultado de hemólise em meio sólido usando, das 75 amostras testadas 62 foram positivas para hemólise em sangue de carneiro (82%), uma porcentagem consideravelmente alta quando comparamos com outros estudos realizados com *E. Coli* isoladas de água de consumo humano., Ribeiro et al encontraram 38 % de positividade para hemólise em sangue de carneiro em 97 amostras.

A atividade lipolítica também se constitui um fator de virulência relevante, uma vez que ela resulta da ação de enzimas capazes de hidrolisar moléculas de gordura e atuar como toxina formadora de poro em caso de colonização de tecido(Panus, et al 2008). Em nossos estudos encontramos 57 isolados positivos para lipólise (76%), corroborando os achados de Panus et al, que mostram um alto índice de atividade lipolítica, com 100% de positividade em *E. coli* isoladas de água de consumo humano.

A produção de biofilme também se destaca no padrão de virulência de *E. coli*, uma vez que ela aderida as células na estrutura de biofilme se torna muito mais resistente a ação dos antibióticos. E também agrega a elas a capacidade de aderir a superfície mucosas e assim iniciar um processo infeccioso(Panus et al, 2008) Nossos testes detectaram 38 (50,6 %)positivas para produção de biofilme em Vermelho Congo.

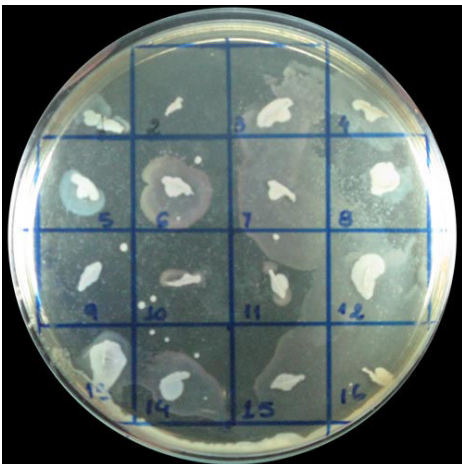
As cepas de *E. coli* exibiram padrão de sensibilidade a maioria dos antibióticos testados, o antibiótico testado com maior índice de resistência foi Ampicilina com 65%, dados que concordam com os resultados apresentados por Panus et al, 2008. Vários antibióticos obtiveram 100% de sensibilidade como: Imipenen, Gentamicina, Ciprofloxacina, Tazobactan, com 100%. Todas as amostras foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, dados esses concordantes com Siya et al, 2008.

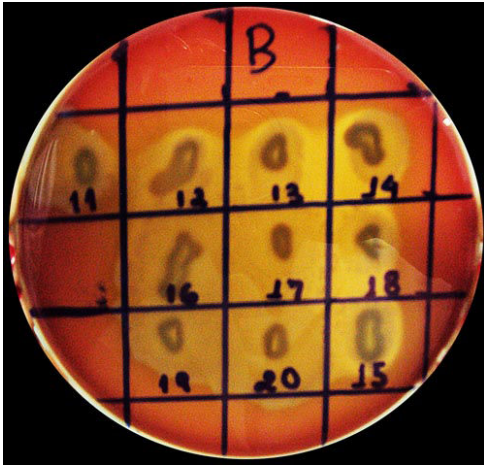
TABELA 1: Atividade enzimática e produção de biofilme.

AMOSTRAS	LIPÓLISE AZEITE		HEMÓLISE CARNEIRO		BIOFILME	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
75						
24 HORAS	45	30	25	50	38	37
	60%	40%	33%	67%	51%	49%
48 HORAS	57	17	62	13	38	37
	76%	23%	83%	17%	51%	49%

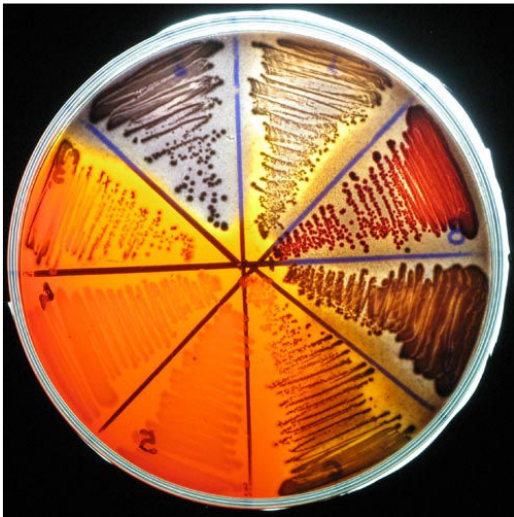
TABELA 1: Padrão de resistência aos antimicrobianos.

# de Amostras:	S		R		I	
	#	%	#	%	#	%
75						
ATM	73	97%	2	3%	0	0%
CRO	73	97%	0	0%	2	3%
CAZ	70	93%	5	7%	0	0%
IPM	75	100%	0	0%	0	0%
CIPRO	75	100%	0	0%	0	0%
SAM	64	85%	2	3%	9	12%
CN	75	100%	0	0%	0	0%
AMP	24	32%	49	65%	2	3%
CXM	57	76%	5	7%	13	17%
AML	41	55%	9	12%	25	33%
TZP	75	100%	0	0%	0	0%
SXT	70	93%	5	7%	0	0%
AMC	35	47%	28	37%	12	16%
TIM	75	100%	0	0%	0	0%

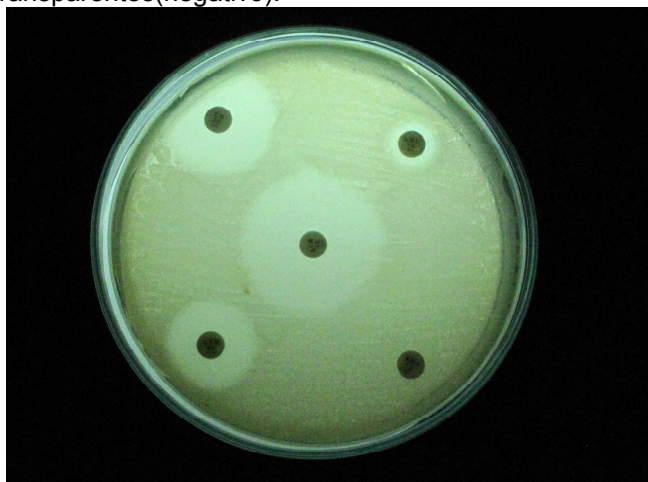
FOTOS: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO**Colônias de E. Coli em Mackonkey****Identificação de E. coli em EPM, MILI, CTRATO.****Halos de Lipólise em Ágar Muulen Hinton (Tuin a 2%)**



Halos de hemólise em ágar sangue de carneiro a 5%



Produção de biofilme em vermelho congo: colônias enegrecidas(positivo), colônias transparentes(negativo).



Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

CONCLUSÕES

-Esses resultados sugerem que esses isolados tem potencial de causar doenças devido a fatores de virulência relacionados com adesão, como biofilme identificados, fatores esses que contribuem para a persistência da bactéria no meio ambiente, principalmente no ambiente aquático e no cólon, caracterizando as diarreias persistentes.

- Na detecção de atividade enzimática (lipólise e hemólise), são importantes fatores de virulência, por causarem danos em tecidos e permitir a sua penetração em camadas de tecidos e subsequente invasão do hospedeiro. Os resultados mostraram que grande parte dos isolados utilizaram os produtos de degradação como nutrientes para o seu crescimento, demonstrando assim a importância dessas enzimas no mecanismo de patogenicidade da bactéria.

-Foram identificados isolados com alto índice de resistência a antibióticos.

-A presença de *E. coli* em água para consumo humano pode causar riscos à saúde da população, portanto as falhas no sistema de tratamento e distribuição de água devem ser minimizadas. As autoridades devem redobrar atenção a fim de que a população receba água de qualidade, isenta de patógenos, como preconiza a legislação.

-O conjunto de dados obtidos é de fundamental importância, considerando que tal abordagem é bastante limitada em nosso meio e está estreitamente associada com a virulência destes microorganismos.

REFERÊNCIAS

ANDREU, A.; STAPLETON, A.E.; FENNELL C.; LOCKMAN, H. A.; XERCAVINS, M.; FERNANDEZ, F. ; STAMM, W. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strain causing prostatitis. J. Infect. Dis. 176: 464-469, 1997.

APOITIA, L.F.M.; ROSA-FILHO, E.F.; BITTENCOURT, A.V.L.; HINDY, E. Caracterização preliminar da qualidade das águas subterrâneas na cidade de Cuiabá-MT. Bo. Par. Geoc. 54, 7-17, 2004.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicol. 98, 229–238, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16.ed. New York: American Public Health Association, 1985.

APOITIA, L. F. M., ROSA-FILHO, E. F., BITTENCOUT, A. V. L., HINDY, E. (2004) Caracterização preliminar da qualidade das águas subterrâneas na cidade de Cuiabá-MT. Bo Par. Geoc 54, 7-17.

BOFF, L. **Ethos mundial**. Rio de Janeiro: Sextante, 2003.

FARNLEITNER, A.H.; KREUZINGER, N.; GRILLENBERGER, S.; KAVKA, G.G.; RATH, J.; MACH, R.L. Simultaneous Detection and Differentiation of *Escherichia coli* Populations from Environmental Freshwaters by Means of Sequence Variations in a Fragment of the b-D-Glucuronidase Gene. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1340–1346, 2000.

FERNANDES, P.C. M.; MARTINS, M.A.C.; COELHO, F.M.; LEMES, E.N.;

GIOMBELLI, A.; RECH, H.; TORRES, V. S. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da Região do Alto Uruguai Catarinense. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 07, n. 2, p. 6-18, 1998.

HAMELIN, K., BRUANT, G., SHAHAAARAWI, A., Applied and Environmental Microbiology, jan 2007 pag 477-484 Occurrence of virulence and Antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems with the St. Clair River and Detroit River areas.

HANSON, L.A., ASHRAF, R., CARLSSON, B., JALIL, F., KARLBERG, J., LINDBLAD, B.S., KHAN, S.R., ZAMAN, S. SAVE THE CHILDREN : 31-38. IN L. A.

HANSON AND L. HOHLER (ED.), PEACE, HEALTH AND DEVELOPMENT. UNIVERSITY OF GOTEBORG & THE NORDIC SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, 1993.

HOEKSTRA, A.Y.; HUNG, P.Q. Virtual water trade: A quantification of virtual water flows between nations in relation to international crop trade. Value of Water Research Series N° 11, UNESCO-IHE, 2002.

LISLE, J.T.; PHYLE, B.H.; McFETERS, G.A. The use of multiple indices of physiological activity to access viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol. 29, 42–47, 1999.

MARTINS, A.M.S.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Identificação dos Microorganismos Presentes na Água Destinada ao Abastecimento Público e Sistema de Purificação de Água. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.37, supl.1, p.55, 2001.

OLIVEIRA, A. C. S. & TERRE, A. P. S. Avaliação microbiológica das águas de bebedouros do campus I da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação á presença de coliformes totais, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37(3):285-286, 2004.

OPAS (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE). Água e Saúde. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health_index.html> Acessado em: 22 out.2010.

VALENTINI, S.R , GOMES, T A., FALCÃO, D. P. Lack of virulence factors in escherichia coli strains of enteropathogenic serogroups isolated from water. Applied and environmental Microbiology ,jan 1992 412 – 414.

NATARO, J. P., and KAPER, J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Micr. Rev., 11(1): 142-201, 1998.

OISEN, S.J., Mackinon, L.C., GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. Morbidity and Mortality Weekly Report, v.49, n.SS01, p.1-51, March 17, 2000.

KOSEK, M., BERN, C. e GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ,v.81, n.3, p.197-204, 2003.

BRASIL. Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Dia Oficial da Rep.

Donnenberg, M. S., Whitthan, T. S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. J Clin Investig 107, 539–548.

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. and Blanch, A. R. (2005) Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolated from.

COOKSON, A. L., et al. Molecular Subtyping and Genetic Analysis of the Enterohemolysin Gene (ehxA) from Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Atypical Enteropathogenic E. coli. Appl Environ Microbiol, v.73, n.20,p.6360-6369, 2007.

SMITH .A. W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*.v. 57, p. 1539-1550, 2005.

MENDONÇA, S. J. R.. Avaliação da Qualidade Bacteriológica e Físico-Química de Águas de uso Residencial. Monografia apresentada ao Curso de Farmácia Bioquímica, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2003.

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

PANUS. E, M.C.B, CHIFRIUC, BUCUR. M., CERNAT, R., MITACHE, M., NEDELCU, D., BLEOTU, C., VALANU, D., LAZAR, V., ROSOIU, N. Virulence, pathogenicity, antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* strains isolated from drinking and recreational waters. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol 13, Issue: 3, pages: 3695-3700.

RAM, S , VAIPAYEE, P., SHANKER, R .Contamination of Potable Water Distribution Systems by Multiantimicrobial-Resistant Enterohemorrhagic *Escherichia coli* . VOLUME 116 | NUMBER 4 | April 2008 • *Environmental Health Perspectives*