VANESSA FEITOSA VIANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR DA REGIÃO COSTEIRA DO
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

VANESSA FEITOSA VIANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR DA REGIÃO COSTEIRA DO
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se
disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca
Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Vanessa Feitosa Viana da.

Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água do mar da região costeira do Estado de São Paulo, Brasil. / Vanessa Feitosa Viana da Silva. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana molecular.

Versão do título para o inglês: Phenotypic and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from seawater samples from the coastal region of the state of São Paulo, Brazil.

1. Biociências 2. Microbiologia 3. Microbiologia ambiental 4. Microbiologia da água 5. Ecologia microbiana I. Rivera, Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB028/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Feitosa Viana da Silva.

Título da Dissertação: Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água do mar da região costeira do Estado de São Paulo, Brasil.

Orientador(a): Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 539/12 referente ao projeto intitulado: “*Caracterização fenotípica e molecular de isolados de Escherichia coli de amostras de água do mar da região costeira do estado de São Paulo*” sob a responsabilidade de **Vanessa Feitosa Viana da Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 08 de agosto de 2012.

p/

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico à minha orientadora Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*)
que não pode ver a conclusão deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, que permitiu a condução desse trabalho sem maiores dificuldades financeiras.

Agradeço a Universidade de São Paulo e tenho muito orgulho de ser Uspiana.

Agradeço ao Banco Santander pela bolsa de Mobilidade Internacional que possibilitou que eu fizesse parte desse mestrado na *University of California*, Irvine, USA.

À Dr^a Irma Nelly Gutierrez Rivera por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação e conselhos durante essa etapa.

Obrigada professora Márcia Pinto Alves Mayer por me acolher nessa etapa final, que além de corrida, foi bem dolorosa, devido à perda da minha orientadora e sua amiga. Agradeço por me ensinar a analisar meus resultados do ponto de vista clínico e pelas dicas de escrita na elaboração da dissertação.

Agradeço a Dr^a Sunny Jiang pela orientação e sabedoria compartilhada durante meu estágio no exterior. Agradecimento especial ao doutorando Keah-Ying Lim por me ensinar a metodologia AQRM e pela amizade que formamos.

Aos antigos e atuais integrantes do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (Cláudia, Gabriel, Ligia, Nádia, Flávio, Thiago, Zita, Bianca e seu Luiz) obrigada pela convivência nesse tempo e troca de conhecimentos.

Agradeço ao Maicon pela sua enorme amizade, por ter compartilhado comigo momentos bons e ruins, por me ensinar as principais técnicas de Biologia Molecular e por tornar os almoços no bandeirão mais divertidos. Sou grata a você por ter lido minha dissertação e pelos conselhos e sugestões valiosas. Desejo que trilhe uma carreira esplendorosa.

Agradeço ao Caio que sempre teve muitos ensinamentos para passar e tornou-se meu amigo, cujo o carinho e a admiração crescem a cada dia. Desejo que trilhe uma carreira de sucesso.

Agradeço a Clau pela oportunidade de acompanhá-la durante sua pesquisa e por tudo que me ensinou. Mesmo sempre bastante ocupada nunca lhe faltou um sorriso no rosto e boa vontade de ensinar. Obrigada por ter corrigido a minha dissertação.

Faço um agradecimento especial ao meu amigo Luciano Queiroz pela sua amizade e pela ajuda na correção da minha dissertação, através de valiosas dicas e críticas. Serei eternamente grata.

Agradeço ao meu amigo Nicolás por me ajudar nessa etapa final e por sempre me ensinar sobre técnicas de biologia molecular.

Agradeço ao Rúbens Duarte nas análises de PCA para os grupos filogenéticos.

Mais um agradecimento especial se faz necessário e esse são para os meus amigos queridos do departamento que tornaram esses anos menos enfadonhos e muito, muito mais agradáveis:

Alejandra, muito obrigada por ter sido sempre tão gentil comigo e pela excelente companheira nas aulas da Medicina;

Aline, você é uma das minhas baianas preferidas, sempre alegre, prestativa e muito legal.

Almir, Luiz, Simone, Guilherme, Lucas, Juliana e Tuany: obrigada pela generosidade e carinho.

Amanda, obrigada por todas as dicas de viagem e por me ensinar a analisar os resultados do HPLC, enfim agradeço pela sua amizade, Amandita.

Bianca, obrigada pelo carinho e confiança ao me convidar para te ajudar no Curso de Inverno de Microbiologia.

Felipe, espero que a nossa amizade continue, você é uma pessoa iluminada, sou feliz por tê-lo conhecido.

Fernanda, obrigada por me explicar sobre purificação de proteínas e outras técnicas referentes à essas macromoléculas.

Obrigada Larisa por todos os almoços, pelas risadas e conselhos.

Luana obrigada pelos ensinamentos e pelas cepas concedidas. Desejo à você uma carreira de sucesso e que brilhe em Paris.

Priscila obrigada por todas as conversas e pelo carinho.

Agradeço ao Ralph por todos os conselhos referentes ao mercado de trabalho.

Verena, minha outra baiana preferida, agradeço por sua amizade e todos os conselhos de nutrição.

Tatiane muito obrigada por todas as cepas que me emprestou e por todas as risadas e conhecimentos, esses que foram principalmente transmitidos durante o trabalho de *Legionella* poderosa haha.

Agradeço a todos os professores que participaram dessa minha formação, em especial aos professores (Beny Spira, Wellington Araújo, Rúbens Duarte e Marilis do Valle Marques).

Por fim, mas não menos importante, eu agradeço à minha mãe por todo o apoio e por sempre torcer pelo meu sucesso. Agradeço ao meu pai. E ao meu noivo Printci Rodrigues, amigo, parceiro e que me acompanha há 11 anos, te amo.

E nada disso seria possível se Deus não estivesse ao meu lado.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande”.

Louis Pasteur

RESUMO

SILVA, V. F. V. **Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água do mar da região costeira do estado de São Paulo, Brasil**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

A qualidade das águas marinhas destinadas a recreação de contato primário pode ser afetada por fontes de poluição pontuais e não pontuais. *Escherichia coli* é membro comensal da microbiota intestinal de humanos e animais endotérmicos e quando presente no ambiente marinho indica contaminação fecal recente. Embora a maioria das cepas desta espécie não seja patogênica para o homem, existem isolados virulentos e/ ou resistentes aos antibióticos. *E.coli* pode ser caracterizada em grupos filogenéticos - GF (A, B1, B2, C, D, E, F e clado I) e em categorias diarreio gênicas (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, EAEC e DAEC). Este trabalho objetivou caracterizar 99 isolados de *E.coli* obtidos de amostras água do mar de três regiões costeiras do estado de São Paulo com diferentes níveis de contaminação [Ubatuba (UBA), oligotrófico (n=20); Baixada Santista (BS), eutrófico (n=30) e canal de São Sebastião (CSS), mesotrófico (n=49)], frente à susceptibilidade aos antibióticos, GF, genes associados à virulência (GAV) e assim estimar os riscos microbiológicos a recreação de contato primário nos locais de coleta. A susceptibilidade a ampicilina (AMP), amoxicilina- ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), cefotaxima (CTX), cefuroxima (CRX), ciprofloxacino (CIP), cloranfenicol (CLO), imipenema (IPM), piperacilina-tazobactam (PPT), sulfametoxazol-trimetropima (SUT) e tetraciclina (TET) foi determinada pelo método de disco difusão. A classificação em GF foi realizada por PCR utilizando duas metodologias (CLERMONT et al., 2000 e 2013). Os GAV (*stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* e *astA*) foram pesquisados por PCR. Os resultados foram utilizados na avaliação quantitativa do risco microbiano (AQRM). Dezenove isolados foram resistentes a AMP, sendo UBA (3%), BS (33%) e CSS (16%). Dezesete isolados foram resistentes a TET: UBA (20%), BS (23%) e CSS (12%); 14 isolados foram resistentes a SUT: UBA e CSS (10%) e BS (23%). As frequências (%) dos GF (Clermont et al., 2000) comensais A e B1 foram, respectivamente (55 e 15 em UBA; 63 e 13 na BS; 69 e 8 no CSS); já as frequências (%) dos GF virulentos B2 e D foram, respectivamente, 5 e 25 em UBA; 7 e 16 na BS; 4 e 18 no CSS. As frequências (%) dos GF (CLERMONT et al., 2013) comensais A, B1 e C foram: respectivamente: (15, 15 e 0 em UBA; 23, 3 e 0 na BS; 4, 10 e 0 no CSS), já os grupos mais virulentos (B2, D, E e F) foram, respectivamente: (15, 15, 0 e 10 em UBA; 13, 27, 0 e 10 na BS; 10, 33, 8 e 18 no CSS); as frequências do clado I em UBA, BS e CSS foram respectivamente: (15, 23 e 12). Os GAV detectados em UBA foram: *astA* (15%) e *bfpA* (5%); BS: *esth* (3%) e *astA* (30%) e no CSS: *stx1* (2%), *eae* (4%), *estp* (2%) e *astA* (47%). Embora não tenha sido detectado risco a recreação de contato primário, observou-se isolados resistentes e GF virulentos em todos os pontos de coleta, dessa forma, esses ambientes devem ser conservados para assegurar a saúde ambiental e humana, além disso a AQRM não representou o risco total de todos micro-organismos e patógenos oportunistas presentes nessas regiões.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Ambiente marinho. Susceptibilidade aos antibióticos. Grupos filogenéticos. Categorias diarreio gênicas. Análise de risco microbiológico.

ABSTRACT

SILVA, V. F. V. **Phenotypic and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from seawater samples from the coastal region of the state of São Paulo, Brazil**. 2015. 119p. Masters Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

The quality of seawater intended for bathing can be affected by sources of point and non-point pollution. In this pollutants may be *Escherichia coli*. *E. coli* is a commensal member of the intestinal tract of humans and endothermic animals, and when present in the marine environment indicates recent fecal contamination. Although most strains are harmless, there are virulent and/or resistant to antibiotics. *E. coli* can be evaluated by phylogenetic groups - PG (A, B1, B2, C, D, E, F, clade 1) and diarrheagenic categories (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, EAEC and DAEC). The aim of the present study was to characterize 99 *E. coli* isolated from seawater samples from three coastal regions of the state of São Paulo with different levels of contamination [Ubatuba (UBA), oligotrophic (n=20); Santos (BS), eutrophic (n=30) and São Sebastião Channel (CSS), mesotrophic (n=49)], in regard to antibiotics susceptibility, PG, virulence genes (VGs) associated with diarrheagenic pathotypes and to estimate the microbiological risks to bathing. The susceptibility to ampicillin (AMP), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), amikacin (AMI), cefotaxime (CTX), cefuroxime (CRX), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CLO), imipenem (IPM), piperacillin-tazobactam (PPT), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT) and tetracycline (TET) was determined by disk diffusion. The classification in regard to GF was performed by PCR using two methodologies (2000 and 2013). The VGs (*stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* and *astA*) were screened by PCR and the results were used to evaluate the microbiological risk by Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA). Nineteen isolates were resistant to AMP: UBA (3%), BS (33%) and CSS (16%). Seventeen isolates were resistant to TET: UBA (20%), BS (23%) and CSS (12%); 14 isolates were resistant to the SUT: UBA and CSS (10%) and BS (23%). By the methodology of 2000, the frequencies (%) of commensals PG and B1 were, respectively, (55 and 15 in UBA; 63 and 13 in BS; 69 and 8 in CSS); while the frequencies (%) of virulent PG, B2 and D were, respectively (5 and 25 in UBA; 7 and 16 in BS; 4 and 18 in CSS). By the methodology of 2013, the frequencies (%) of PG commensals A, B1 and C were, respectively: (15, 15 and 0 in UBA; 23, 3 and 0 in BS; 4, 10 and 0 in CSS), on the other hand, the most virulent groups (B2, D, E and F) were, respectively: (15, 15, 0 and 10 in UBA; 13, 27, 0 and 10 in BS; 10, 33, 8 and 18 in CSS); clade 1 frequencies in UBA, BS and CSS were, respectively (15, 23 and 12). The VGs were detected in UBA; *astA* (15%) and *bfpA* (5%); BS: *esth* (3%) and *astA* (30%) and CSS: *stx1* (2%), *eae* (4%), *estp* (2%) and *astA* (47%). Although no microbiological hazard was detected to bathing, was observed resistant isolates and virulent PG, thereby these environments should be preserved to ensure the environmental and human health, moreover the QMRA did not represent the overall risk of all microorganisms and opportunistic pathogens present in these regions.

Keywords: *Escherichia coli*. Marine environment. Antibiotics susceptibility. Phylogenetic groups. Diarrheagenic categories. Microbiological risk assessment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Análise do *triplex* PCR proposto por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). A classificação em grupo filogenético de *E.coli* é realizada pela análise das amplificações positivas (+) ou negativas (-) para os genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2.....26
- Figura 2** - Localização dos pontos de coletas de *E.coli* nas regiões de Ubatuba, canal de São Sebastião e Baixada Santista, estado de São Paulo, Brasil.....40
- Figura 3:** Esquema de interpretação do resultado do PCR para os grupos filogenéticos de *E.coli* denominados A, B1, B2, C, D, E, F e clado I, acordo com a metodologia de Clermont et al. (2013). U- perfil desconhecido.....45
- Figura 4** - Frequência observada (%) de resistência aos antibióticos em *E.coli* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo (Ubatuba n=20, Baixada Santista n=30 e canal de São Sebastião n=49).....52
- Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do *simplex* PCR dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* isolada de Ubatuba (n=20).....53
- Figura 6** - Frequência (%) dos grupos filogenéticos observados em cada região de coleta de acordo com a metodologia de Clermont et al. (2013).....56
- Figura 7** – Porcentagem de isolados resistentes a antibióticos em cada grupo filogenético de *E.coli* (A, B1, B2 e D) utilizando a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) (em relação ao total de 99 isolados analisados).....60
- Figura 8** – Gráfico representando o risco de doença causada por *E.coli* diarreiogênica entre banhistas de diferentes sexo e grupos de idade em amostras de *E.coli* obtidas da Baixada Santista e do Canal de São Sebastião. O risco de doença que corresponde a concentração máxima permitida de *E.coli* em águas destinadas a recreação de contato primário, de acordo com a Resolução Conama nº 274 de 2000, também está representado para comparação (baseado na porcentagem média de genes de virulência de *E.coli* encontrados nas amostras da Baixada Santista e no Canal de São Sebastião). Cada caixa representa o inferior, mediana e quartil superior (por exemplo 25%, 50% e 75%) da distribuição, onde as extensões 1,5 x (valor percentil de 75% - valor percentil de 25%) estão no final de cada caixa.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados na identificação dos grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	43
Tabela 2 – Classificação dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> de acordo com as combinações dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e TspE4.C2.....	43
Tabela 3 – Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados na identificação dos grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> pela metodologia de Clermont et al. (2013).....	44
Tabela 4 – Iniciadores utilizados para detecção de cinco categorias de <i>E.coli</i> diarreio gênicas.....	46
Tabela 5 – Frequência (%) dos grupos A, B1, B2 e D e subgrupos filogenéticos (A ₀ , A ₁ , B2 ₂ , B2 ₃ , D ₁ e D ₂) de <i>E.coli</i> , identificados por <i>simplex</i> PCR nos isolados de Ubatuba, Baixada Santista e do Canal de São Sebastião de acordo com a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e identificação por subgrupo proposta por Escobar-Páramo et al., (2004).....	54
Tabela 6A - Resultados dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> isoladas de Ubatuba utilizando duas metodologias diferentes.....	57
Tabela 6B - Resultados dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> isoladas da Baixada Santista utilizando duas metodologias diferentes.....	57
Tabela 6C - Resultados dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> isoladas do Canal de São Sebastião utilizando duas metodologias diferentes.....	58
Tabela 7 - Número de isolados apresentando genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênicas e frequência (%) de detecção por PCR nos isolados de Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião, estado de São Paulo, Brasil.....	61
Tabela 8 – Concentrações mínima, mediana e máxima de <i>E.coli</i> (UFC/100 mL) em amostras obtidas na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião.....	61
Tabela 9 – Risco de doença para homens, mulheres e crianças (intervalo de confiança de 95%) ocasionado por <i>E.coli</i> diarreio gênicas isoladas em amostras de água do mar na Baixada Santista, no Canal de São Sebastião e no pior cenário.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
<u>2.1 Principais características fenotípicas e genotípicas de <i>E.coli</i> pesquisadas neste estudo.....</u>	21
2.1.1 Antibióticos e resistência bacteriana.....	24
2.1.2 Grupos filogenéticos de <i>E.coli</i>.....	25
2.1.2.1 A classificação em grupos filogenéticos pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	25
2.1.2.2 Classificação em grupos filogenéticos pela metodologia de Clermont et al. (2013).....	28
2.1.3 <i>E.coli</i> diarreio gênica.....	29
2.1.3.1 ETEC.....	30
2.1.3.2 EPEC.....	30
2.1.3.3 EHEC.....	31
2.1.3.4 EIEC.....	32
2.1.3.5 EAEC.....	33
2.1.3.6 DAEC.....	33
<u>2.2 Risco microbiológico de <i>E.coli</i> isolada de ambientes aquáticos.....</u>	34
3 OBJETIVOS.....	37
<u>3.1 Objetivo Geral.....</u>	37
<u>3.2 Objetivos específicos.....</u>	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
<u>4.1 Locais e período das coletas.....</u>	39
<u>4.2 Concentrações de <i>E.coli</i>.....</u>	40
<u>4.3 Análises microbiológicas.....</u>	40

4.3.1 Cultura de <i>E.coli</i> e confirmação da identidade por provas bioquímicas.....	40
4.3.2 Teste de susceptibilidade aos antibióticos.....	41
<u>4.4 Análises genotípicas</u>	41
4.4.1 Extração do DNA genômico.....	41
4.4.2 Caracterização genotípica dos isolados pela análise de agrupamento filogenético.....	42
4.4.2.1 Determinação do grupo filogenético de <i>E.coli</i> pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	42
4.4.2.1.1 Análises dos resultados dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	43
4.4.2.2 Determinação do grupo filogenético de <i>E.coli</i> pela metodologia de Clermont et al. (2013).....	43
4.4.2.2.1 Análises dos resultados dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> pela metodologia de Clermont et al. (2013).....	45
4.4.3 Detecção de genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreiogênica.....	46
<u>4.5 Análise do risco microbiológico da presença de <i>E.coli</i> diarreiogênicas em áreas destinadas a recreação de contato primário, utilizando a metodologia de Avaliação Quantitativa do Risco Microbiano (AORM)</u>	47
4.5.1 Tratamento dos dados da PCR para os genes associados à virulência de cinco categorias de <i>E.coli</i> diarreiogênicas.....	47
4.5.2 Análise do risco microbiológico.....	48
4.5.3 Identificação do perigo microbiológico.....	48
4.5.4 Avaliação da exposição.....	48
4.5.5 Avaliação da dose-resposta- Probabilidade de doença por evento marinho.....	49
4.5.6 Simulação do pior cenário possível.....	49
<u>4.6 Análise estatística</u>	50
5 RESULTADOS	51
<u>5.1 Análises microbiológicas</u>	51
5.1.1 Reisolamento de <i>E.coli</i> e confirmação da identidade bioquímica.....	51

<u>5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos</u>	51
<u>5.3 Grupos filogenéticos de <i>E.coli</i></u>	52
5.3.1 Determinação do grupo filogenético pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	52
5.3.2 Determinação do grupo filogenético pela metodologia de Clermont et al. (2013)...	54
5.3.3 Comparação das metodologias para análise dos grupos filogenéticos de <i>E.coli</i>	57
<u>5.4 Resistência aos antibióticos e grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)</u>	60
<u>5.5 Detecção de genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênica</u>	61
<u>5.6 Análise do risco microbiológico da presença de <i>E.coli</i> diarreio gênicas em áreas destinadas a recreação de contato primário, utilizando a metodologia de Avaliação Quantitativa do Risco Microbiano (AQRM)</u>	61
6 DISCUSSÃO	65
<u>6.1 Resistência aos antibióticos</u>	65
<u>6.2 Grupos filogenéticos e comparação entre as metodologias propostas por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)</u>	69
<u>6.3 Grupos filogenéticos e a resistência aos antibióticos</u>	74
<u>6.4 Detecção de genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênicas e relação com grupo filogenético</u>	75
<u>6.5 Risco microbiológico da presença de <i>E.coli</i> diarreio gênicas em áreas destinadas à recreação de contato primário</u>	79
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS¹	85
APÊNDICES	95
APÊNDICE 1A: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e as possíveis categorias encontradas nas amostras de Ubatuba.....	95
APÊNDICE 1B: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e possíveis categorias de encontradas nas amostras da Baixada Santista.....	96

APÊNDICE 1C: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de <i>E.coli</i> diarreio gênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e possíveis categorias encontradas nas amostras do canal de São Sebastião.....	97
APÊNDICE 1D.1: Tabela exemplificando como a concentração patogênica de <i>E.coli</i> foi determinada.....	98
APÊNDICE 1D.2: Concentrações mínima, máxima e mediana de <i>E.coli</i> patogênica por grupo de banhistas.....	99
APÊNDICE 1D.3: Cálculo da Dose de exposição (D_{exp}) dos banhistas à <i>E.coli</i> patogênica, de acordo com o volume de água ingerido por evento marinho e com a concentração de <i>E.coli</i> patogênica.....	99
APÊNDICE 1D.4: Determinação da probabilidade de doença ocasionado por <i>E.coli</i> diarreio gênicas em áreas destinadas a recreação de contato primário.....	100
APÊNDICE 2A: Resultados gerais do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de <i>E.coli</i> de Ubatuba.....	101
APÊNDICE 2B: Resultados gerais do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de <i>E.coli</i> da Baixada Santista.....	102
APÊNDICE 2C: Resultados gerais do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de <i>E. coli</i> do canal de São Sebastião.....	103
APÊNDICE 3A: Resultado do <i>simplex</i> e <i>triplex</i> PCR para os grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> dos isolados de Ubatuba pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	105
APÊNDICE 3B: Resultado do <i>simplex</i> e <i>triplex</i> PCR para os grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> dos isolados da Baixada Santista pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	106
APÊNDICE 3C: Resultado do <i>simplex</i> e <i>triplex</i> PCR para os grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> dos isolados do canal de São Sebastião pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).....	108
APÊNDICE 4A: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de <i>E. coli</i> de Ubatuba aplicando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013).....	110
APÊNDICE 4B: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de <i>E. coli</i> da Baixada Santista aplicando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)	111
APÊNDICE 4C: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de <i>E. coli</i> do canal de São Sebastião aplicando as metodologias de Clermont, e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)	113

APÊNDICE 5A: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada de Ubatuba.....115

APÊNDICE 5B: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada da Baixada Santista.....116

APÊNDICE 5C: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada do canal de São Sebastião.....118

1 INTRODUÇÃO

A qualidade das águas recreacionais marinhas destinadas a recreação de contato primário pode ser afetada por fontes de poluição pontuais (esgotos industriais, domésticos e efluentes de emissários submarinos) e por fontes não pontuais (escoamento de águas pluviais e ressuspensão de sedimentos contaminados) (HAMILTON, 2010; KING, 2013; RIVERA; MARTINS, 1996; RIVERA et al., 2008; <http://water.epa.gov/polwaste/nps/index.cfm>).

Os efluentes domésticos contêm matéria fecal e quando lançados no mar prejudicam a qualidade das águas marinhas, que representam importantes fontes de recursos recreacionais no Brasil. De acordo com o Instituto Trata Brasil, em 2013, apenas 62,3% dos esgotos gerados foram tratados, sendo que na zona costeira do país esse número é mais alarmante. Por exemplo, na região da Baixada Santista de 60% de esgoto gerado pela população em 2010, apenas 10% foram tratados (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2010). Esta descarga de esgoto bruto humano dentro do mar ocorre devido à baixa capacidade das plantas das estações de tratamento da região e agrava-se durante o período de férias por conta do elevado número de turistas (CETESB, 2005).

Estes efluentes podem conter compostos químicos e micro-organismos que prejudicam a biodiversidade marinha e tem potencial de afetar a saúde dos banhistas através da inalação de aerossóis, ingestão acidental de água e/ou entrada através das mucosas, e causar doenças dermatológicas ou agravar feridas pré-existentes (ABDELZAHER et al., 2010; ABESSA et al., 2005; BRAGA et al., 2000; WESTRELL et al., 2004).

Com o intuito de estudar e caracterizar o ambiente marinho em relação à qualidade de suas águas e diversidade microbiana, o Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a coordenação da prof^a Dra Irma Nelly Gutierrez Rivera, conduz trabalhos, desde 2005, na região costeira do Estado de São Paulo, mais especificamente na Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba.

Nos projetos abordados foram analisados proteobactérias, vibrios, colifagos, leveduras e bactérias quitinolíticas, nestas regiões que têm diferentes níveis de contaminação. Dentre os micro-organismos frequentemente presentes nos efluentes de esgoto doméstico destaca-se a espécie *Escherichia coli* (CETESB, 2011; POMMEPUY, 2005). *E. coli* é membro comensal da microbiota intestinal de humanos e animais endotérmicos e quando presente no ambiente marinho indica contaminação fecal recente. No entanto, esta espécie compreende também patógenos.

Em ambientes contaminados, ao contrário de águas pristinas, a entrada de efluentes de esgoto poderia resultar em maior pressão seletiva produzida pelos antibióticos, favorecendo o estabelecimento de cepas resistentes a estes agentes.

Até hoje são poucos os estudos que caracterizam fenotipicamente e genotipicamente amostras de *E.coli* isoladas de águas marinhas recreacionais, e são mais escassos ainda os estudos que avaliam o risco microbiológico relacionado à presença desses isolados (HAMILTON et al., 2010).

Assim, consideramos que a caracterização fenotípica e genotípica de *E.coli* isoladas em áreas destinadas a recreação de contato primário, em Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião, irá alertar sobre os possíveis impactos à saúde pública e ambiental, o que auxiliará na discussão de estratégias para a conservação de nossos ecossistemas costeiros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Principais características fenotípicas e genotípicas de *E.coli* pesquisadas neste estudo

O nome *Escherichia coli* é uma homenagem ao pediatra alemão Theodor Escherich que descobriu a bactéria em 1885. Essa espécie trata-se de um bacilo móvel gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e é membro natural da microbiota intestinal de humanos e animais endotérmicos e encontrada em elevadas concentrações nas fezes (INGERSON-MAHAD; REID, 2011; NATARO; KAPER, 1998). A presença de *E.coli* no ambiente aquático é utilizada como um indicador de contaminação fecal recente, uma vez que a exposição à luz ultravioleta diminui a sobrevivência e a viabilidade de se multiplicar, no entanto no ambiente marinho esse processo é acentuado por conta do efeito da salinidade (GOURMELON et al., 1997; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; NATARO; KAPER, 1998).

A microbiota residente no intestino auxilia na digestão dos alimentos, produção de vitaminas, como K e B12, e dificulta o estabelecimento de micro-organismos exógenos (INGERSON-MAHAD; REID, 2011). Por *E.coli* ser um organismo anaeróbio facultativo, ou seja, em condições nutricionais e de cultura apropriadas pode crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, ao consumir o oxigênio presente no intestino, que é tóxico para a maioria dos micro-organismos, possibilita que espécies anaeróbias estritas se desenvolvam (INGERSON-MAHAD; REID, 2011; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A microbiota intestinal pode ser afetada pelo tratamento com antibióticos de amplo espectro, o que possibilita que micro-organismos prejudiciais sejam favorecidos (INGERSON-MAHAD; REID, 2011).

E.coli pode ser isolada em meios de cultura contendo lactose na sua formulação muitas vezes acrescidos de reagentes fluorogênicos que permitem avaliar a presença da enzima beta-D-glucoronidase (caldo Lauril Tryptose, Caldo EC, Ágar Azul de Metileno [EMB – *Eosin Methylene Blue*] e ágar Mac Conkey). A identificação é confirmada através dos testes bioquímicos conhecidos com a sigla IMViC (Produção de Indol, Vermelho de Metila, *Voges-Proskauer* e assimilação de Citrato). O teste de indol é importante para a diferenciação de cepas de *E.coli* de outros membros da família *Enterobacteriaceae*, pois 99% das cepas desta espécie são produtoras de indol (MARTINS et al., 1992; NATARO; KAPER, 1998).

Embora, a maioria das cepas de *E.coli* seja comensal, em indivíduos imunossuprimidos ou debilitados, ou, ainda, quando as barreiras gastrointestinais são

violadas, cepas não patogênicas de *E.coli* podem causar infecção. Além disso, na população de *E.coli* há diferentes linhagens que variam no seu potencial patogênico e perfil de resistência aos antibióticos, o que confere potencial risco à saúde pública. Esta diferenciação pode ser feita através da pesquisa de características morfológicas e genotípicas (<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>; <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O145-06-12/index.html>; KAPER; MELLIES; NATARO 1999; MARTINS et al., 1992; NATARO; KAPER, 1998).

O perfil sorológico pode ser investigado pela pesquisa de antígenos de superfície, os quais são representados pela letra “O” (somático), presentes no flagelo; representados pela letra “H”; ou na cápsula, os quais são representados pela letra “K”. Outras características fenotípicas que permitem a diferenciação de cepas de *E. coli* são os testes de susceptibilidade a antibióticos, o estudo do perfil enzimático, por exemplo utilizando as técnicas de MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) e a ribotipagem (HERZER et al., 1990; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; SELANDER; CAUGANT; WHITTAM, 1987).

Variações no potencial de patogenicidade de amostras de *E. coli* podem ser determinadas pela pesquisa de genes associados à virulência. É interessante notar que estes são associados a determinados grupos filogenéticos dentro da espécie e assim a análise filogenética pode indicar o potencial patogênico da cepa (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013; FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013; GOLLER; SEED, 2010; HERZER et al., 1990; INGERSON-MAHAD; REID, 2011).

A estrutura clonal de *E.coli* permite a classificação em grupos filogenéticos. A primeira abordagem nesse sentido foi conduzida por Selander, Caugant e Whittam (1987) e por Herzer et al. (1990) ao estudar polimorfismo de enzimas de manutenção (*house-keeping*) em cepas da coleção de referência de *E.coli* (ECOR) através de MLEE e análise de DNA fita simples multi-cópia (msDNA) o que permitiu descrever os quatro principais grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). No entanto, como essa técnica era laboriosa e demorada, em 2000 Clermont, Bonacorsi e Bingen propuseram uma PCR baseada no uso dos seguintes marcadores moleculares: genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*, denominado *triplex* PCR (BLATTNER, 1997; GORDON et al., 2008; MILLS; PAYNE, 1995; TORRES; PAYNE, 1997).

Treze anos depois, com o avanço dos dados genômicos produzidos pelo sequenciamento do genoma de *E. coli* e de múltiplos genes codificando enzimas de manutenção (*Multilocus Sequencing Type*, MLST) os pesquisadores observaram que havia divergências entre os resultados gerados pelo *triplex* PCR e os dados de sequenciamento e

MLST, dessa forma, elaboraram uma reformulação do método, desenhando novos iniciadores e incluindo mais genes como marcadores moleculares. Atualmente, os isolados de *E.coli* podem ser classificados em sete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) e em clado I de *E.coli* (CLERMONT et al., 2013).

Algumas cepas de *E.coli* podem causar desde infecções intestinais (doenças diarreio gênicas) até doenças extra-intestinais. Para *E.coli*, que está presente no ambiente, causar infecção intestinal é necessário ter obrigatoriamente três características: ser capaz de entrar no intestino, sendo esse acesso promovido pela ingestão de água contaminada, e ou, alimento contaminado; permanecer neste ambiente e ter habilidade para desregular as funções celulares normais deste órgão (INGERSON-MAHAD; REID, 2011).

As cepas de *E.coli* que causam diarreias são classificadas em seis categorias: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e *E.coli* com aderência difusa (DAEC), e todas essas podem ser distinguidas através de seus mecanismos de patogenicidade e genes associados à virulência (DONNENBER; KAPER, 1992; FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013; NATARO; KAPER, 1998).

Esses genes associados à virulência podem estar presentes em diversos elementos genéticos: fagos, transposon, ilhas de patogenicidade, integrons, que podem estar localizados em cromossomos ou em plasmídeos (FLUIT; SCHMITZ, 2004; HACKER et al., 1997; KAPER; MELLIES; NATARO, 1999). Entretanto, a presença de genes associados à virulência não indica necessariamente que a cepa é patogênica, mas que ela tem uma combinação apropriada de genes de virulência para iniciar o mecanismo de patogênese em populações ou sítios específicos (GILMORE; FERRETI, 2003).

Além da presença de *E.coli* virulenta, a alta pressão seletiva produzida pelo uso indiscriminado dos antibióticos, por exemplo, na terapia clínica ou como promotores de crescimento na pecuária, possibilitou que a resistência bacteriana emergisse como um problema de saúde pública. A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno biológico natural ocasionado por mutações pontuais, mas pode ser acentuada pela pressão seletiva ocasionada por esse intenso uso (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2001). A capacidade de *E.coli* em transferir horizontalmente seu material genético, mediante processos de transdução e conjugação, possibilita que cepas não resistentes adquiram genes que codificam para a resistência. Isto tem feito que *E. coli* comensais atuem como reservatório de genes de resistência a antibióticos (BALDINI;

CABEZALI, 1991; BIBI et al., 1999; DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; GREENE; REID, 2012; MAAL-BARED, 2013).

Outra preocupação é quando a resistência aos antimicrobianos está combinada com um perfil de virulência, embora a ocorrência dessa relação ainda seja discutida por pesquisadores. Por exemplo, Kawamura-Sato et al. (2010) ao estudar 312 isolados de *E.coli* de pacientes com infecção urinária em sete hospitais no Japão, sugeriram que não seria vantajoso energeticamente um organismo resistente codificar fatores associados à virulência, pois isso definiria um *trade-off*. No entanto, esta relação foi observada no clone epidêmico *E.coli* O25-H4 do tipo ST131, o qual pertence ao grupo filogenético B2 (considerado virulento) e apresenta resistência a CTX- M15 e a fluoroquinolona (JOHNSON et al., 2010).

Dessa forma, a análise dessas duas características é extremamente importante, uma vez que a transferência genética horizontal por fagos e plasmídeos possibilita a emergência de novas variantes patogênicas (HACKER et al., 1997).

2.1.1 Antibióticos e resistência bacteriana

Os antibióticos podem ser naturais ou sintéticos e referem-se a qualquer classe de molécula orgânica que pode apresentar atividade bacteriostática ou bactericida (DAVIES; DAVIES, 2010). Os antibióticos têm como papel ecológico primário a inibição do crescimento de organismos competidores e os micro-organismos que os produzem possuem mecanismos de resistência a essas moléculas (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; MARTÍNEZ, 2008; WAKSMAN; WOODRUFF, 1940).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são: alteração do sítio alvo do antibiótico, biodegradação, alteração da molécula e bombas de efluxo. Observou-se em algumas bactérias isoladas do solo a capacidade de biodegradar os antibióticos presentes nesse ambiente e utilizá-los como fonte de carbono (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; KÜMMERER, 2009a,b; MARTÍNEZ, 2008; WAKSMAN; WOODRUFF, 1940).

O uso exacerbado dos antibióticos na prática clínica humana e animal, na aquicultura e como promotores de crescimento na pecuária permitiu que mecanismos de resistência secundária, ou seja, aqueles que são desenvolvidos durante o contato de um micro-organismo com o antibiótico, emergissem como um problema de saúde pública. Os estudos mostram que quando os antibióticos, oriundos das práticas terapêutica, pecuária e aquicultura, atingem os corpos hídricos, podem ocorrer modificações da estrutura de populações microbianas naturais

(COLLIGNON et al., 2009; KÜMMERER, 2009a,b; MARTÍNEZ, 2009; SMITH; COAST, 2002).

Os mecanismos da transferência da resistência bacteriana aos micro-organismos presentes em humanos por bactérias presentes na água, alimentos, efluentes ou fertilizantes ainda são obscuros. Dessa forma, para evitar a minimização da rota de resistência microbiana, a entrada de antibióticos e bactérias resistentes no ambiente são gerenciadas por órgãos governamentais através do monitoramento microbiano pela estipulação de concentrações máximas permitidas de indicadores de contaminação fecal (KÜMMERER, 2009a,b).

2.1.2 Grupos filogenéticos de *E.coli*

O genoma de *E.coli* contém cerca de 10.000 genes e essa ampla variedade permite a existência de diversos fenótipos por conta da combinação gênica (CLERMONT et al., 2011). O elevado grau de fluxo gênico possibilita que essa espécie tenha variações clonais, fenômeno este estudado por Selander, Caugant e Whittam (1987) e Herzer et al. (1990) em 72 cepas de *E.coli* da coleção de referência (ECOR), o que permitiu a classificação em quatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; DURIEZ et al., 2001; HERZER et al., 1990).

2.1.2.1 A classificação em grupos filogenéticos pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

As dificuldades técnicas do MLEE caracterizadas pela complexidade e demora nos resultados na avaliação dos grupos filogenéticos fez com que, em 2000, um grupo de pesquisadores franceses desenvolvesse um PCR rápido e simples baseado na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 como marcadores filogenéticos, denominado *triplex* PCR (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

O gene *chuA* tem homologia com o gene *shuA* de *Shigella dysenteriae* e foi inicialmente detectado em cepas de *E.coli* O157:H7. A localização desse gene é cromossomal e está envolvido no sistema de transporte do grupo heme como fonte de ferro, através da codificação de um regulador de ferro (TORRES; PAYNE, 1997). O gene *yjaA* foi detectado inicialmente no genoma de *E.coli* K-12 e codifica uma proteína hipotética com função desconhecida (BLATTNER, 1997). Afset et al. (2006) consideraram que a ausência deste gene poderia ser utilizada como um marcador filogenético para EPEC atípica com baixo

potencial diarreio gênico, devido a ausência desse gene em 37 isolados de EPEC atípica obtidos de fezes de crianças com diarreia e a presença desse gene nos 20 isolados de crianças sem diarreia. O gene TspE4.C2, antes denominado como fragmento anônimo de DNA, codifica para uma lipase esterase putativa (GORDON et al., 2008).

Para avaliação e confirmação do *triplex* PCR para classificação de *E. coli*, foram analisadas 72 cepas da coleção ECOR, previamente estudadas por Herzer et al. (1990), e 86 cepas causadoras de meningite neonatal; 34 cepas associadas à septicemia neonatal com ou sem meningite; 30 cepas isoladas de fezes de neonatos saudáveis; uma cepa de *E.coli* uropatogênica; 10 cepas produtores de verotoxina e 9 cepas isoladas de diferentes regiões da França. Com este método, os autores classificaram a população da bactéria nos grupos A, B1, B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Em 1998, Lecointre et al. sugeriram que os grupos B2 e D eram grupos irmãos que adquiriram durante o período evolutivo o gene *chuA* presente em um ancestral comum, enquanto os grupos-irmãos A e B1 perderam esse gene. E esta mesma característica foi observada por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) na aplicação do *triplex* PCR. Já a diferenciação dos isolados dos grupos B2 e D foi obtida pela análise da presença ou ausência do gene *yjaA*, pois esse esteve presente em 100% das cepas pertencentes ao grupo filogenético B2, e ausentes nos isolados do grupo D. Por última instância, a classificação dos isolados em grupos A ou B1 foi possível pela análise da presença do gene TspE4.C2 nos isolados do grupo A (Figura 1) (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Figura 1- Análise do *triplex* PCR proposto por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). A classificação em grupo filogenético de *E.coli* é realizada pela análise das amplificações positivas (+) ou negativas (-) para os genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2

Fonte: Adaptado de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Gordon e Cowling (2003) demonstraram que estes filo-grupos podiam diferir em seus nichos ecológicos e evolução. Sendo que essa diferenciação era determinada pela habilidade em explorar diferentes fontes de açúcar, perfis de resistência a antibióticos e taxa de crescimento (GORDON, 2003). Segundo Duriez et al. (2001) os grupos A e B1 são dominantes na população de *E.coli* comensal e têm maiores taxas de resistência a antibióticos quando comparados aos grupos B2 e D, com exceção das cepas ST131 (grupo B2) e ST405 (grupo D) que apresentam um fenótipo de multiressistência.

O grupo A é considerado uma linhagem distinta que compreende a cepa K-12 (cepa comensal) e acredita-se que seja mais relacionado a isolados obtidos de cepas comensais da microbiota de humanos. O grupo B1 é prevalente em *E.coli* isolada de mamíferos não-primatas. As cepas pertencentes ao grupo B2 estão mais associadas a isolados de fezes de humanos e outros primatas, enquanto em *E.coli* isolada de fezes de aves observa-se predominância do grupo D (CLERMONT et al., 2008; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2006; HERZER et al., 1990; JOHNSON et al., 2005; SELANDER; CAUGANT; WHITTAM, 1987).

Em relação ao potencial de patogenicidade, as cepas comensais de *E.coli* dos grupos filogenéticos A, B1 e D têm poucos determinantes de virulência quando comparadas às cepas virulentas. No entanto, cabe ressaltar que a aquisição de genes associados à virulência mediante processos de transferência horizontal podem torná-las patogênicas, o que já foi descrito por Johnson et al. (2001) ao observar que isolados pertencentes aos grupos A e B1 estavam associados com infecções extra-intestinais. No entanto, as cepas comensais do grupo B2 são potencialmente virulentas, o que explica o fato das cepas desse grupo serem frequentemente isoladas de pacientes com infecção extra-intestinal, e serem raras na microbiota intestinal (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; DURIEZ et al., 2001).

Considera-se que, além do grupo B2, os isolados do grupo D também estejam associados a amostras obtidas de indivíduos com infecção extra-intestinal. No entanto, embora estes dois grupos sejam considerados mais virulentos, eles apresentam frequência rara na população de *E.coli* (BINGEN et al., 1998; BUKH et al., 2009; DURIEZ et al., 2001; JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001; PICARD et al., 1993; PICARD et al., 1999).

Ainda em relação à frequência, Duriez et al. (2001) ao estudarem 168 cepas de *E.coli* isoladas da microbiota comensal de populações humanas geograficamente distintas, observaram que os grupos A e B1 eram os mais frequentes (40 e 34%, respectivamente), o grupo mais raro foi representado pelo B2 (11%), enquanto o grupo D teve uma frequência de

15%. No entanto, o grupo filogenético B1 foi detectado em baixa frequência (7,4%) no estudo conduzido por Bailey et al. (2010) ao analisar 68 amostras de *E.coli* isoladas de fezes de indivíduos saudáveis e com histórico de ausência de uso de antibióticos por 6 meses. E essa baixa frequência do grupo B1 comparado aos outros grupos também foi observada no estudo de Ahmed et al. (2011), cujas frequências detectadas dos grupos A, B1, B2 e D foram 32%, 16%, 22,5% e 29,5%, respectivamente, ao estudar isolados de *E. coli* obtidos de amostras de águas pluviais.

2.1.2.2 Classificação em grupos filogenéticos pela metodologia de Clermont et al. (2013)

Após treze anos do desenvolvimento do *triplex* PCR, os avanços nos dados de sequenciamento do genoma e de MLST permitiram conhecer melhor a variabilidade genética em isolados de *E.coli* (CLERMONT et al., 2013). A partir disso, pesquisadores começaram a comparar esse *pool* de dados genômicos com a metodologia de classificação dos grupos filogenéticos proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e constataram que os agrupamentos filogenéticos gerados pelo *triplex* PCR apresentavam apenas 80 a 85% de similaridade com os dados de MLST e que uma significativa fração das cepas com os genótipos de subgrupos A₀, D₁ e D₂ [classificação em subgrupo foi proposta por Escobar-Páramo et al. (2004)] estavam incorretas (CLERMONT et al., 2013).

Dessa forma, reformularam o método de classificação de filogrupos e desenhou-se novos iniciadores para os genes *chuA* forward, *yjaA* e TspE4.C2, no entanto mantiveram a mesma sequência nucleotídica do iniciador *chuA* reverse. Na nova classificação foram acrescentados dois genes: *arpA* e *trpA*. A inclusão do gene *arpA* vai ao encontro de duas propostas: este gene atua como um controle interno da qualidade do DNA, pois se nenhum dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 forem amplificados em um isolado, a PCR para *arpA* deverá gerar um produto; segundo, ele permite que cepas pertencentes ao grupo F, mas com o genótipo característico do grupo D: *chuA* +, *yjaA* – e TspE4.C2 –, sejam corretamente classificadas, pois esse gene está apenas ausente no isolados do grupo F e B2 e presente em todos os outros isolados de *E.coli* (CLERMONT et al., 2004).

Atualmente, o novo método proposto por Clermont et al. (2013) permite a classificação em 7 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) e em clado I de *E.coli* (CLERMONT et al., 2013).

Os novos grupos propostos (C, E e F) e o clado I de *E.coli* permitem uma melhor caracterização dos isolados. No grupo C observam-se cepas fortemente relacionadas, mas com

características distintas do grupo B1 (CLERMONT et al., 2011; MOISSENET et al., 2010). Os grupos E e F são considerados virulentos e frequentemente compostos por isolados de infecções extra-intestinais (WALK et al., 2009). O grupo E é formado por um pequeno número de cepas não distintas de maneira adequada anteriormente, que tem *E.coli* O157:H7 como melhor representante (TENAILLON et al., 2010). Essa cepa era classificada como pertencente ao grupo D pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Os grupos F, D e B2 tem um ancestral comum e apresentam potencial de virulência (CLERMONT et al., 2011; JAUREGUY et al., 2008). De acordo com Walk et al. (2009), o clado I de *E.coli* tem características genótípicas distintas de todos os outros isolados da espécie, mas são fenotipicamente indistinguíveis, além de possuírem elevado grau de recombinação com cepas de *E.coli*, e geralmente este clado é composto por isolados que não fazem parte da microbiota intestinal.

Os resultados da PCR para os genes *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 e *arpA* ainda permitem a distinção entre cepas de *E.coli* e clado I, e das cepas pertencentes aos clados crípticos II, III, IV e V de outras espécies de *Escherichia*. As cepas pertencentes aos clados III, IV e V possuem o gene *chuA* e as do clado II, não. No entanto, quando é feita o *multiplex* PCR para a pesquisa dos quatro genes (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 e *arpA*) para as cepas dos clados III, IV e V, o gene *chuA* não é amplificado. Esses clados (III, IV e V) são identificados através da ausência de amplificação para estes 4 genes e pela presença de um produto de amplificação com tamanho de 476 pb, resultado do pareamento do iniciador AceK.f com o gene *chuA* e do iniciador chuA.2 (CLERMONT et al., 2013).

E. fergusonii e *E. albertii* possuem características fenotípicas distintas de *E.coli*, no entanto, na maioria das cepas de *E. albertii* o gene TspE4.C2 é detectado; enquanto que com o DNA de *E. fergusonii* não há formação de produto para todos os genes testados no método proposto por Clermont et al. (2013).

2.1.3 *E.coli* diarreiogênica

Escherichia coli causadoras de diarreia são nomeadas como diarreiogênicas e agrupadas em seis categorias: *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteropatogênica (EPEC), típica ou atípica, *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* com aderência difusa (DAEC) (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004; NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER;

GOMES, 2002; <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>, 2011). A seguir, serão descritos os principais marcadores de cada uma das categorias.

2.1.3.1 ETEC

E.coli enterotoxigênica ou ETEC é transmitida por contaminação fecal-oral e sua adesão ao epitélio intestinal dá-se por meio de fatores de colonização (CFs), tais como fímbrias (estruturas filamentosas protéicas localizadas na superfície bacteriana) (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996). ETEC é responsável por 400 milhões de episódios de diarreia nos países em desenvolvimento, acometendo, principalmente, crianças menores de cinco anos, além de ser agente causador da diarreia do viajante. ETEC secreta duas toxinas: a enterotoxina termo-estável (ST), que tem duas formas STp ou STh, ambas codificadas por genes, *estp* ou *estph*, em plasmídeos, mas que também já foram encontradas em transposon, e a enterotoxina termo-lábil (LT) codificada pelo gene *elt*. Essas toxinas são responsáveis pela secreção de íons e água no intestino delgado. LT tem homologia com a toxina colérica e em casos mais sérios de diarreia provocada por ETEC, a toxina LT produz uma condição parecida com a colérica (NATARO; KAPER, 1998; TAXT et al., 2010). A toxina LT induz o aumento do cAMP intracelular, que regula sistemas de transporte de membrana, de enzimas e tem efeitos sobre o citoesqueleto, resultando em diminuição na absorção de sódio e cloreto pelas células absorptivas e secreção de ânions pelas células da cripta (NATARO; KAPER, 1998).

Quando ST é secretada em baixas concentrações no intestino, esta se liga e ativa o receptor de guanilato-ciclase (GC-C) nas células epiteliais do intestino delgado, o que resulta no aumento do mensageiro cíclico intracelular GMP (cGMP). O cGMP media alterações no fluído intestinal promovendo uma redução da absorção de íons sódio e cloreto e aumenta a secreção de bicarbonato e cloreto, resultando em diarreia aquosa (CRANE et al., 1992; TAXT et al., 2010).

2.1.3.2 EPEC

E.coli enteropatogênica ou EPEC causa diarreia aquosa, normalmente com presença de vômito e baixo grau de febre. A presença do plasmídeo EAF (fator de aderência de EPEC) e o padrão de aderência a células HEp-2 permitem a classificação de EPEC em dois tipos: típica e atípica. EPEC típica tem o plasmídeo EAF que contém o gene *bfpA* que codifica para a proteína BFP (*bundle-forming pilus*) e um único padrão de aderência que é o de aderência

localizada (LA, *localized adherence*). Por outro lado, EPEC atípica não possui o plasmídeo EAF e pode conter três padrões de aderência: LAL (*localized-like adherence*); difusa, DA (*diffuse adherence*) e agregativa (AA, *aggregative adherence*) (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

O reservatório de EPEC típica é o homem e essa categoria causa diarreia principalmente em crianças em países em desenvolvimento, enquanto EPEC atípica tem importante papel na diarreia em países industrializados, e tanto o homem quanto os animais atuam como reservatórios (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A patogenia causada por EPEC caracteriza-se pela destruição das microvilosidades do epitélio intestinal e a íntima adesão entre a célula bacteriana e a membrana do enterócito, resultando na polimerização de actina e outros componentes do citoesqueleto e formação de um pedestal no sítio alvo. Isto caracteriza o mecanismo central de patogenicidade de EPEC conhecido como “*attaching and effacing*” (A/E). Esta adesão da bactéria à membrana do enterócito é promovida pela proteína intimina, codificada pelo gene *eae* localizado em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano em um locus denominado LEE (*locus of enterocyte effacement*), contendo outros genes que codificam fatores associados à lesão A/E (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Deve ser ressaltado que o gene *eae* não está presente somente em EPEC, mas também em EHEC, e em cepas de outras espécies bacterianas e é ausente nas cepas de *E. coli* que não produzem a lesão A/E (NATARO; KAPE, 1998).

2.1.3.3 EHEC

E.coli enterohemorrágica ou EHEC pertence a uma categoria de *E.coli* que produz uma toxina similar à produzida pelo gênero *Shigella*, denominada toxina *Shiga-like* também conhecida como STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga) ou *E.coli* produtora de verotoxina (VTEC), essa que é codificada por um fago (GYLES, 1992). Os sorogrupos de EHEC estão associados a casos de gastroenterites, diarreia sanguinolenta (quando causam pequenos danos nos vasos sanguíneos que recobrem o intestino) e síndrome hemolítica urêmica, que em casos agudos podem causar falência renal em crianças (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; KARMAI, 1989; NATARO; KAPER, 1998; TORRES, 2010). As infecções causadas por EHEC podem acometer indivíduos de qualquer idade, no entanto, os casos mais sérios e até mesmo a síndrome hemolítica urêmica são frequentes em crianças e

idosos; mas isso não exclui a possibilidade de adultos jovens e crianças mais velhas desenvolverem uma infecção séria (http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html#what_shiga).

Os genes associados à virulência de EHEC *stx1* e *stx2* que codificam para as toxinas *Shiga-like* (*Stx1* e *Stx2*, respectivamente), podem ser encontrados em fagos lisogênicos toxigênicos (KARMALI, 1989), mas para que o processo infeccioso ocorra é necessária a presença do gene *eae*, esse que pode estar em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; CHEN et al., 2005; HACKER et al., 1997; NATARO; KAPER, 1998).

O reservatório de STEC são os ruminantes, especialmente o gado, e as principais formas de transmissão são a ingestão de água ou comida contaminadas por fezes contendo a cepa, distribuição pessoa-pessoa e o contato com animais (KARMALI, 1989).

De acordo, com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) o sorogrupo O157: H7 (pertencente a EHEC) foi identificado pela primeira vez como patógeno em 1982, além disso esse sorogrupo foi responsável por vários surtos principalmente no Canadá, Japão, Reino Unido e Estados Unidos. Já, no surto ocorrido na Europa em 2011 foi isolado o sorogrupo O104:H4 (<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>).

2.1.3.4 EIEC

Segundo, Brenner et al. (1973) as cepas de *E.coli* enteroinvasina ou EIEC têm características genéticas, bioquímicas e patogenia semelhantes as de *Shigella* spp., além de serem descarboxilase lisina negativa, não móveis e lactose negativa. No processo patogênico de EIEC estas cepas invadem e penetram o epitélio do colón, seguido da lise de vacúolos endocíticos e multiplicação bacteriana nesse ambiente e posterior movimento direcional através do citoplasma até às células epiteliais adjacentes. Essa invasão é associada por genes que codificam para invasinas, tais como o gene *invE* presente no plasmídeo pinV (FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013) localizados em plasmídeos, e caracterizada pela liberação de uma ou mais enterotoxinas que tem influência no desencadeamento da diarreia aquosa (NATARO; KAPER, 1998).

A diarreia aquosa precede a disenteria (fezes caracterizadas pela presença de muco e sangue). A semelhança de EIEC com *Shigella* spp. faz com que muitas vezes a detecção de EIEC como causadoras de surtos seja comprometida. A transmissão de cepas de EIEC é mais

associada a água e alimentos contaminados por essa categoria de *E.coli*, mas em alguns casos a transmissão pessoa a pessoa pode ocorrer (NATARO; KAPER, 1998).

2.1.3.5 EAEC

E. coli enteroagregativa ou EAEC é caracterizada pela aderência agregativa a células HEp-2, e as células bacterianas agregadas adotam uma conformação parecida com ‘tijolos empilhados’, não secretam as toxinas LT e ST (NATARO; KAPER, 1998) e podem apresentar os genes *aggR* e *astA*. O gene *aggR* codifica para um ativador de transcrição para a expressão de uma fímbria do tipo I (NATARO et al., 1994).

O gene *astA* codifica a enterotoxina termo estável (EAST-1) que embora possa estar relacionada a casos de diarreia (prevalência pode variar de 26 a 87% em cepas de EAEC isoladas de casos de diarreia em humanos), ainda tem a função e patogenicidade questionadas, uma vez que estudos conduzidos com voluntários que receberam elevadas concentrações desta toxina não desenvolveram diarreia (FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013; MÉNARD; DUBREUIL, 2002; SAVARINO et al., 1993).

No processo infeccioso essas cepas produzem muco e promovem a formação de um biofilme que pode estar relacionado ao potencial diarreio gênico e talvez, à habilidade de colonização persistente. A diarreia é do tipo aquosa e em alguns casos é sanguinolenta, com febre baixa e pouco ou ausência de vômito. A transmissão por EAEC tem caráter cosmopolita, sendo do tipo fecal-oral e acometendo desde crianças até adultos (NATARO; KAPER, 1998).

2.1.3.6 DAEC

De acordo com Nataro e Kaper (1998) o termo DAEC (*E.coli* com aderência difusa) foi primeiramente utilizado para descrever qualquer cepa de *E.coli* que aderisse de maneira difusa a células HEp-2, sem a formação de microcolônias como em EPEC. Esta característica fez com que DAEC fosse apenas reconhecida como uma categoria independente de *E.coli* diarreio gênica quando EAEC foi descoberta, pois diferentemente de EAEC, DAEC não apresenta o padrão agregativo, formando ‘tijolos empilhados’. Em um ensaio realizado com células HEp-2 as bactérias são vistas dispersas sobre a superfície celular, com pouca aderência e pouca agregação (NATARO; KAPER, 1998).

Embora haja pouca informação sobre a patogenia de DAEC e muitas vezes não considerada como uma categoria de *E.coli* diarreiogênica, quando são isoladas de fezes de pessoas com diarreias, essa prevalência dá-se principalmente em crianças de um a cinco anos (NATARO; KAPER, 1998).

2.2 Risco microbiológico de *E.coli* isolada de ambientes aquáticos

A qualidade das águas do ambiente marinho é essencial para assegurar aos banhistas condições sanitárias adequadas para a recreação de contato primário, quando há um contato direto e prolongado com a água, através da natação, mergulho, ou esqui-aquático, nos quais há possibilidade de ingestão de quantidades apreciáveis de água. A qualidade das águas destinadas a este tipo de recreação é denominada balneabilidade (<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/Praias/18-balneabilidade>).

As fontes de poluição pontual (esgotos domésticos, industriais e efluentes de emissários submarinos) e não pontuais (escoamento de águas pluviais, ressuspensão de sedimentos contaminados, condições de maré) afetam a balneabilidade e as condições ecológicas do ambiente aquático (HAMILTON, 2010; KING, 2013; RIVERA; MARTINS, 1996; RIVERA et al., 2008).

Nestes efluentes podem estar presentes micro-organismos de origem fecal (*E.coli*, coliformes totais e enterococos) e patógenos oportunistas: *Shigella*, *Leptospira*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, norovírus e adenovírus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Devido ao fácil isolamento e presença em elevadas concentrações nas fezes, *E.coli*, junto a coliformes totais e enterococos, é utilizada pela Resolução Conama n° 274 de 2000, pela *United States Environmental Protection Agency* (US. EPA) e pela *World Health Organization* (WHO) como indicador de qualidade das águas recreacionais. Ainda, segundo a WHO (1999), no efluente de esgoto pode haver de 10^6 - 10^7 UFC de *E.coli*/ mL de esgoto.

De acordo com a resolução Conama n° 274/2000, que dispõe sobre as condições de balneabilidade, as praias podem ser classificadas em duas categorias: Própria e Imprópria. Na categoria Própria há três subcategorias: Excelente, Muito Boa e Satisfatória, todas essas relacionam-se a determinadas concentrações dos indicadores de poluição fecal (BRASIL, 2000).

No Brasil, nos programas de monitoramento das condições de balneabilidade das praias do estado de São Paulo, o limite máximo permitido de *E.coli* para que a praia seja considerada própria para banho é de 800 UFC/100 mL em 80% das amostras em um conjunto

de cinco amostras consecutivas obtidas em cinco semanas em um mesmo local. Quando esses limites não são atingidos, a praia recebe uma bandeira vermelha, notificando que está imprópria para banho (BRASIL, 2000; CETESB, 2006).

E mesmo em praias consideradas próprias, podem haver cepas de *E.coli* virulentas e/ou resistentes à antibióticos, que podem causar infecções intra ou extra-intestinais, apresentando um risco microbiológico à saúde pública, embora essas características não sejam avaliadas nos programas de balneabilidade.

Define-se como risco a combinação da chance + perigo + exposição + consequência, que resumidamente estima a probabilidade dos perigos identificados em causar danos em populações expostas em um determinado período de tempo e as gravidades resultantes dessa exposição (http://qmrawiki.msu.edu/index.php?title=Quantitative_Microbial_Risk_Assessment).

Uma maneira de avaliar o risco microbiológico relacionado à presença de *E.coli* patogênica em áreas destinadas a recreação de contato primário é através do emprego da metodologia de avaliação quantitativo do risco microbiano (AQRM ou *Quantitative Microbial Risk Assessment*, QMRA).

A AQRM compreende três passos iniciais: identificação do perigo microbiológico; avaliação da exposição; avaliação da dose-resposta, sendo que o resultado gerado pode indicar o risco de infecção ou doença (http://qmrawiki.msu.edu/index.php?title=Hazard_Identification).

A identificação do perigo consiste da etapa em que coletam-se informações gerais sobre o agente microbiano estudado e os efeitos que este pode causar no hospedeiro caso haja uma infecção. Dentre as informações obtidas nessa etapa, tem-se, por exemplo, a taxa de mortalidade causada por determinado micro-organismo; incidência de doença na população e tempo de incubação. Pode-se também determinar quais são os genes de virulência detectados em determinada amostra (SCHETS; SCHIJVEN; HUSMAN, 2011).

Para a avaliação da exposição é necessário conduzir uma pesquisa na literatura afim de determinar quais são os volumes de água ingeridos por crianças, mulheres e homens por evento marinho, em apenas um evento recreacional (SCHETS; SCHIJVEN; HUSMAN, 2011). Por exemplo, para *E.coli* isolada do ambiente marinho, a partir do volume de água ingerido pelos banhistas, estima-se a dose oral através da multiplicação entre o valor de água ingerido pela concentração de *E.coli* patogênica (concentração de *E.coli* x % de amostras codificando pelo menos um gene associado à virulência).

Na determinação da dose-resposta é necessário optar pelo modelo exponencial ou de Beta-Poisson, os quais representam funções matemáticas determinadas empiricamente para patógenos específicos afim de estimar o risco de doença, infecção ou morte. Para *E.coli* isolada de hospedeiros humanos o modelo Beta-Poisson se ajusta melhor (HAAS et al., 2000).

Diante de toda a problemática apresentada, são poucos os estudos que caracterizam amostras de *E.coli* isoladas de águas marinhas recreacionais, e são mais escassos ainda os estudos que avaliam o risco microbiológico relacionado à presença desses isolados (HAMILTON et al., 2010). Portanto, a aplicação da AQRM irá permitir determinar se essas áreas estudadas apresentam risco microbiológico à saúde pública em relação a doenças associadas a *E. coli*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente amostras de *Escherichia coli* isoladas de água do mar de três regiões costeiras do estado de São Paulo com diferentes níveis de atividade antropogênica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade dos isolados a antibióticos;
- Determinar os grupos filogenéticos dos isolados;
- Verificar a presença dos principais genes associados à virulência de cinco categorias de *E.coli* diarreio gênica (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC e EAEC);
- Determinar a relação entre resistência a antibióticos, grupos filogenéticos e local de coleta;
- Determinar a relação entre resistência e grupos filogenéticos;
- Determinar a relação entre grupos filogenéticos e detecção de genes associados à virulência;
- Avaliar o risco microbiológico com base na presença de *E.coli* diarreio gênicas em áreas destinadas a recreação de contato primário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais e período das coletas

Noventa e nove isolados de *E.coli*, depositados na coleção de cultura do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), foram utilizadas no presente estudo. Esses isolados foram obtidos a partir de amostras de água do mar coletadas em três regiões costeiras do Estado de São Paulo (Canal de São Sebastião, n = 49; Baixada Santista, n = 30 e Ubatuba, n = 20) com diferentes níveis de contaminação fecal (mesotrófico, eutrófico e oligotrófico, respectivamente) (BURBANO-ROSETO et al., 2011) (Figura 2).

As amostras de água foram coletadas no período de 2005 a 2007 (BURBANO-ROSETO et al., 2011), levando em consideração os dados de balneabilidade apresentados no relatório anual da CETESB (2004) para a seleção dos pontos de estudo.

No Canal de São Sebastião, as amostras foram obtidas no período de agosto de 2005 a março de 2007, em dois pontos: Ponto 1- em frente à Praia do Segredo (Latitude 23 ° 49 ' 50 '' S, Longitude 45 ° 25 ' 20 '' W), Ponto 2 - na região norte da Praia de Baraqueçaba (Latitude 23 ° 49 ' 56 '' S, Longitude 45 ° 25 ' 51 '' W). Em Ubatuba, as amostras foram coletadas entre os meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007 em dois pontos: Ponto 1 – (Latitude 23 ° 30 ' 02 '' S/ Longitude 45 ° 07 ' 07 '' W) e Ponto 2 - (Latitude 23 ° 30 ' 41 '' S/ Longitude 45 ° 06 ' 04 '' W). Na Baixada Santista, as amostras foram obtidas entre os meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007 em três pontos de coleta: Ponto 1 - entrada da cidade de São Vicente (Latitude 23 ° 59 ' 56 '' S/ Longitude 46 ° 22 ' 26 '' W), Ponto 2 - Boca da Barra, depois da Ilha das Palmas (Latitude 24 ° 02 ' 25 '' S/Longitude 46 ° 19 ' 20 '' W) e Ponto 3 – próximo à Marina Astúrias (Latitude 23 ° 59 ' 50 '' S/ Longitude 46 ° 17 ' 99 '' W) (Figura 2).

Figura 2 - Localização dos pontos de coletas de *E.coli* nas regiões de Ubatuba, Canal de São Sebastião e Baixada Santista, estado de São Paulo, Brasil

Fonte: SALES (2009)

4.2 Concentrações de *E.coli*

As concentrações de *E.coli* (UFC/100 mL) foram determinadas anteriormente a esse estudo pela técnica da membrana filtrante em ágar mFC Difco (Difco, Sparks, MD, Estados Unidos) por colaboradores do Laboratório de Ecologia Microbiana e Molecular. As informações detalhadas das coletas de *E.coli* podem ser vistas em Burbano-Rosero et al. (2011).

Os dados de concentração obtidos em cada local de coleta foram tabulados e esses resultados foram analisados neste estudo para a determinação das concentrações mínima (min), máxima (max) e média (med). As concentrações observadas em cada local de coleta foram: <1 min, 86 max e 7,84 med no Canal de São Sebastião; <1 min, 912 max e 154 med na Baixada Santista; e <1 min, 1 max e 0,99 med em Ubatuba.

4.3 Análises microbiológicas

4.3.1 Cultura de *E.coli* e confirmação da identidade por provas bioquímicas

Os isolados, armazenados em temperatura ambiente em Ágar Luria Bertani (LB), foram inoculados em Caldo Lauril Triptose (Difco) e incubados por 24 horas a 37 °C. Após

esse período, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo Agar *Mac Conkey* e Eosina Azul de Metileno (Difco) para verificar sua pureza e viabilidade. As colônias características de *E.coli*, foram selecionadas em ágar Eosina Azul de Metileno, armazenadas em ágar LB inclinado (Difco) e submetidas aos testes bioquímicos: Indol, Vermelho de Metila, *Voges-Proskauer* e Citrato (IMViC) para confirmação da espécie *E.coli*, segundo as recomendações da *American Public Health Association* (APHA, 2005).

4.3.2 Teste de susceptibilidade aos antibióticos

A susceptibilidade dos isolados aos antibióticos foi avaliada pelo método de disco difusão, segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012). A avaliação foi realizada utilizando os seguintes antibióticos: ampicilina 10 µg (AMP), amoxicilina - ácido clavulânico 20/10 µg (AMC), amicacina 30 µg (AMI), cefotaxima 30 µg (CTX), cefuroxima 30 µg (CRX), ciprofloxacino 5 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CLO), imipenema 10 µg (IPM), piperacilina-tazobactam 100/10 µg (PPT), sulfametoxazol-trimetropima 23,75/1,25 µg (SUT) e tetraciclina 30 µg (TET) (Cefar Diagnóstica Ltda, Jurubatuba, SP, Brasil). *E.coli* 25922 (ATCC), *E.coli* 35218 (ATCC) e *Staphylococcus aureus* (ATCC) foram empregados como controles em todos os ensaios.

4.4 Análises genotípicas

4.4.1 Extração do DNA genômico

Os isolados foram cultivados em caldo LB (Difco) por 24 horas a 37 °C e as células bacterianas foram separadas por centrifugação a 10.0 G por 2 minutos. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* Promega (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos) mediante as orientações do fabricante.

Após a extração do DNA bacteriano, a qualidade e concentração do DNA foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1 % (UltraPure™ Agarose Invitrogen Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e quantificação em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

4.4.2 Caracterização genotípica dos isolados pela análise de agrupamento filogenético

A caracterização dos isolados em grupos filogenéticos foi realizada utilizando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013).

4.4.2.1 Determinação do grupo filogenético de *E.coli* pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Os genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 foram detectados por *simplex* PCR e as reações que resultaram em produto para algum deles foram repetidas por *triplex* PCR. Os iniciadores utilizados nesse estudo foram sintetizados pela empresa Exxtend (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) e suas respectivas sequências, assim como as referências usadas encontram-se na Tabela 1.

O *simplex* e o *triplex* PCR foram realizados com o kit *HotStart PCR PreMix* 0,2 mL (Bioneer Corporation, Seocho-gu, Seoul, Coreia do Sul). Para o *simplex* PCR adicionou-se ao kit 18,40 µL de água livre de nucleases Sigma (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) e 0,3 µL do iniciador *forward* e 0,3 µL *reverse* (20 µM) de cada gene e 1 µL de DNA molde (20 ng/µL). Já para o *multiplex* PCR adicionou-se 0,3 µL de cada um dos seis iniciadores (20 µM) e 15,4 µL de água livre de nucleases (Sigma) e 1 µL de DNA molde (20 ng/µL).

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) com as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificação, sendo a desnaturação a 94 °C por 30 seg , anelamento a 59 °C por 30 seg e a extensão por 1 min a 72 °C, seguido por uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Utilizou-se DNA de *E.coli* 25922 (ATCC) como controle negativo para todos os genes, DNA da cepa de *E.coli* O157: H7 foi usado como controle positivo para os genes *chuA* e TspE4.C2 e como controle positivo para o gene *yjaA* utilizou-se DNA de *E.coli* 35401 (ATCC).

Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) utilizando os marcadores de peso molecular 100 pb (Promega) e 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

Tabela 1 - Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados na identificação dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Genes	Nome do iniciador	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado
<i>chuA</i>	<i>chuA1</i>	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'	279 pb
	<i>chuA2</i>	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
<i>yjaA</i>	<i>yjaA1</i>	5'-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG-3'	211 pb
	<i>yjaA2</i>	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	
TspE4.C2	TspE4.C2.1	5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3'	152 pb
	TspE4.C2.2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	

Fonte: Adaptado de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

4.4.2.1.1 Análises dos resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Os resultados da PCR foram avaliados de acordo com Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e a subclassificação segundo Escobar-Parámo et al. (2004) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos grupos filogenéticos de *E.coli* de acordo com as combinações dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2

Grupo	Subgrupo	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2
A	A ₀	-	-	-
	A ₁	-	+	-
B1	B1	-	-	+
B2	B2 ₂	+	+	-
	B2 ₃	+	+	+
D	D ₁	+	-	-
	D ₂	+	-	+

Fonte: Adaptado de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Escobar-Páramo et al. (2004).

4.4.2.2 Determinação do grupo filogenético de *E.coli* pela metodologia de Clermont et al. (2013)

Os genes *chuA*, *yjaA* e *arpA* foram amplificados individualmente utilizando o *kit ProfiTaq PCR Pre-mix* (Bioneer) e o gene TspE4.C2 com o *kit HotStart PCR PreMix* 0,2 mL (Bioneer). Todos os iniciadores foram sintetizados pela empresa Exxtend e as sequências oligonucleotídicas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados na identificação dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* pela metodologia de Clermont et al. (2013)

Genes	Nome do iniciador	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Tamanho do produto de amplificação (pb)
<i>chuA</i>	chuA1b	5'-TGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	5'-CAAACGTGAAGTGTCTCAGGAG-3'	211
	yjaA.2b	5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	
TspE4.C2	TspE4.C2.1b	5'-CACTATTTCGTAAGGTCATCC-3'	152
	TspE4.C2.2b	5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	
<i>arpA</i>	AceK.f	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400
	ArpA1.r	5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	
<i>trpA</i>	trpAgpC.1	5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'	219
	trpAgpC.2	5'-TCTGCGCCGGTACGCCC-3'	
<i>trpA</i>	trpBA.f	5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'	489
	trpBA.r	5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	
<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	5'-ATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	301
	ArpAgpE.r	5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	

Nota: Análises conduzidas de acordo com a metodologia proposta por Clermont et al. (2013).

Fonte: Adaptado de Clermont et al. (2013).

Para cada reação foram adicionados uma mistura de 0,9 µL de cada iniciador *forward* e *reverse* na concentração prévia de 2,5 µM; 2,0 µL do DNA do isolado (100 ng/ µL) e o volume ajustado para 20 µL com água livre de nuclease (SIGMA). Para os genes *chuA*, *yjaA* e *arpA* as condições de amplificação foram: 1 ciclo de pré-desnaturação a 95 °C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 seg; anelamento a 59 °C por 20 seg; extensão a 68 °C por 1 min. Após os 30 ciclos foi realizada uma extensão final a 68 °C por 3 min. Para o gene TspE4.C2 as condições de amplificação foram: pré-desnaturação a 94 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 59 °C por 1 min, extensão de 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os genes *trpA* e *arpA* foram detectados através de reações individuais de amplificação para detecção dos grupos C e E, respectivamente. Foi realizada uma reação adicional como controle da qualidade do DNA, empregando os iniciadores: trpBA.f e trpBA.r. Em todas as reações utilizou-se o kit *ProfiTaq PCR Pre-mix* (Bioneer).

Nas reações para o grupo C utilizou-se 0,2 µL do iniciador trpAgpC.1 (20 µM), 0,2 µL do iniciador trpAgpC.2 (20 µM) e 2 µL de DNA molde (25 ng/ µL) e um volume de 17,6 µL de água livre de nucleases (SIGMA). Para as reações de controle interno foram utilizados 0,5 µL de cada um dos iniciadores trpBA.f e trpBA.r (20 µM), 2 µL de DNA molde (25 ng/ µL) e 17 µL de água livre de nucleases (SIGMA). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de pré-desnaturação: 95 °C por 5 min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 seg, anelamento a 59 °C por 20 seg e extensão a 68 °C por 1 min. A extensão final foi a 68 °C por 3 min.

Para as reações do grupo E foram utilizados 0,5 µL de cada iniciador (ArpAgpEf e ArpAgpE.r) à uma concentração inicial de 20 µM, 2 µL de DNA (25 ng/ µL) e 17 µL de água livre de nucleases (SIGMA). A PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de pré-desnaturação a 95 °C por 5 min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 seg, anelamento a 57 °C por 20 seg e extensão a 68 °C por 20 seg. A extensão final foi a 68 °C por 3 min.

Ao final da reação, 2,5 µL dos produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) sem adição de *loading dye*- de acordo com recomendações do fabricante (*Bioneer*), os quais foram submetidos à eletroforese por duas horas a 90V. Utilizou-se os marcadores de peso molecular de 100 pb (Promega) e 1 Kb (Invitrogen). Após eletroforese os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* Bio-Rad.

4.4.2.2.1 Análises dos resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* pela metodologia de Clermont et al. (2013)

Os resultados das amplificações foram interpretados de acordo com o cladograma proposto por Clermont et al. (2013) (Figura 3).

Figura 3: Esquema de interpretação do resultado do PCR para os grupos filogenéticos de *E.coli* denominados A, B1, B2, C, D, E, F e clado I, acordo com a metodologia de Clermont et al. (2013). U- perfil desconhecido

Nota: A partir do primeiro conjunto de resultados da PCR envolvendo os genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* e *arpA*, decide-se por amplificações adicionais para detectar possíveis isolados de grupos C e E e do clado I de *E.coli*.
Fonte: Adaptado de Clermont et al. (2013).

4.4.3 Detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica

As reações de amplificação foram adaptadas do protocolo proposto por Fujioka, Otomo e Ahsan (2013). Foram realizadas duas etapas de PCR. Na primeira, realizou-se um *multiplex* PCR com o kit *HotStart* PCR *PreMix* 0,2 mL (Bioneer) para os seguintes genes: *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *invE*, *aggR*, *elt* e *astA*. As reações foram conduzidas com 20 µL da mistura de reação com os iniciadores na concentração inicial de 20 µM: 0,1 µL dos iniciadores: *stx2F* e *sxt2R*; 0,2 µL dos iniciadores: *stx1F*, *sxt1R*, *eltF*, *eltR*, *invE1* e *invE2*; 0,25 µL dos iniciadores *bfpAF* e *bfpAR*; 0,3 µL dos iniciadores *astAF* e *astAR*; 0,35 µL dos iniciadores *eaeF*, *eaeR*, *aggR1* e *aggR2*, e 5 µL de DNA (100 ng/µL) e utilizou-se água livre de nuclease (SIGMA) para completar o volume de 20 µL. As condições da reação foram: uma pré-desnaturação a 94 °C por 5 min, seguindo de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, e o passo de extensão final a 72 °C por 10 min.

A segunda etapa das reações de PCR consistiu de amplificações individuais para os genes: *esth* e *estp* com o kit *HotStart* PCR *PreMix* 0,2 mL (Bioneer). Para amplificação do gene *esth* utilizou-se 0,2 µL dos iniciadores *esth-F* e *esth-R* nas concentrações iniciais de 20 µM e a reação foi conduzida da seguinte forma: uma pré-desnaturação a 94 °C por 5 min, seguindo de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e o passo de extensão final a 72 °C por 10 min. O gene *estp* foi amplificado nas seguintes condições: uma pré-desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento a 55 °C por 30 seg, extensão a 68 °C por 10 seg, e uma extensão final a 68 °C por 3 min.

Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram sintetizados pela empresa Exxtend e estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Iniciadores utilizados para detecção de cinco categorias de *E.coli* diarreio gênica

(continua)

Gene alvo	Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' to 3')	T _m (°C)	Tamanho do produto de amplificação
<i>stx1</i>	<i>stx 1 F</i>	5'- AGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3'	60	347
	<i>stx 1 R</i>	5'- CACCAGACAATGTAACCGC-3'	58	
	<i>stx 2-F</i>	5'- TTCGGTATCCTATTCCCGG-3'	58	
<i>stx2</i>	<i>stx 2-R</i>	5'- CGTCATCGTATACACAGGAG-3'	60	589
<i>eae</i>	<i>eae-F</i>	5'- CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC-3'	74	881
	<i>eae-R</i>	5'- CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG-3'	82	

Tabela 4: Iniciadores utilizados para detecção de cinco categorias de *E.coli* diarreio gênicas

(continuação)

Gene alvo	Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' to 3')	T _m (°C)	Tamanho do produto de amplificação
<i>bfpA</i>	<i>bfpA-F</i>	5'- AATGGTGCTTGCCTTGCTGC-3'	66	324
	<i>bfpA-R</i>	5'- GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'	64	
<i>aggR</i>	<i>aggR-1</i>	5'- GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3'	58	254
	<i>aggR-2</i>	5'- ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'	60	
<i>elt</i>	<i>elt-F</i>	5'- AACGTTCCGGAGGTCTTATG-3'	60	511
	<i>elt-R</i>	5'- CAACCTTGTGGTGCATGATG-3'	60	
<i>esth</i>	<i>esth-F</i>	5'- TTCACCTTTCCCTCAGGATG-3'	60	172
	<i>esth-R</i>	5'- ATAGCACCCGGTACAAGCAG-3'	62	
<i>estp</i>	<i>estp-F</i>	5'- ACTGAATCACTTGACTCTTCA-3'	58	120
	<i>estp-R</i>	5'- TCACAGCAGTAAAATGTGTTGT-3'	60	
<i>invE</i>	<i>invE-1</i>	5'- GCAGGAGCAGATCTTGAAG-3'	58	208
	<i>invE-2</i>	5'- GAAAGGCACGAGTGACTTTC-3'	60	
<i>astA</i>	<i>astA-F</i>	5'- CCATCAACACAGTATATCCG-3'	58	101
	<i>astA-R</i>	5'- ACGGCTTTGTAGTCCTTCCA-3'	60	

Fonte: Adaptado de Fuijoka, Otomo e Ahsan (2013).

Após amplificação, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100 V por 10 min e depois a 90 V por 1 h e 20 min. Após a eletroforese, o gel foi corado em brometo de *etídeo* (0,5 µg/mL). A imagem foi capturada no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR Bio-Rad*.

Em todas as reações foram usadas cepas padrão de *E.coli* como controle positivo e as reações que amplificaram para algum gene foram repetidas por *simplex* PCR, de acordo com as mesmas condições e volumes de iniciadores apresentados anteriormente, com exceção para o gene *invE* que foi amplificado com o *kit* ProfiTaq PCR *PreMix* 0,2 mL (Bioneer) e suas condições de amplificação também foram alteradas para 0,9 µL de cada iniciador a 20 µM, nas seguintes condições: pré-desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos: desnaturação a 95 °C por 5 min, anelamento a 55 °C por 30 seg, extensão a 68 °C por 20 seg; e uma extensão final a 68 °C por 3 min.

4.5 Análise do risco microbiológico da presença de *E.coli* diarreio gênicas em áreas destinadas a recreação de contato primário, utilizando a metodologia AQRM

4.5.1 Tratamento dos dados da PCR para os genes associados à virulência de cinco categorias de *E.coli* diarreio gênicas

Os resultados das reações de PCR foram convertidos em um modelo de probabilidade binominal para cada local de coleta. Criou-se uma tabela, com m x n (linhas x colunas)

contendo uma matriz binária (1 e 0) para representar resultados de amplificação positivos e negativos, respectivamente (LIM; JIANG, 2013). Para este cálculo foi considerado “1” como resultado positivo por linhas, e embora um mesmo isolado tenha amplificado para mais de um gene, considerou-se apenas um resultado positivo. Após este tratamento, foi calculado a porcentagem de 1 em cada local de coleta, o que representou a porcentagem de genes de virulência de *E.coli* diarreiogênicas por local de coleta (Apêndice 1A, 1B e 1C).

4.5.2 Análise do risco microbiológico

As análises de risco foram realizadas no período de Outubro a Dezembro de 2014, na Universidade da Califórnia, Irvine, sob a orientação da Dra Sunny Jiang e do doutorando Keah-Ying Lim. Usou-se o software MATLAB R20010a (The Mathworks Inc., Natick, MA, Estados Unidos) de acordo com a metodologia AQRM ([http://qmrawiki.msu.edu/index.php?title=Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_\(QMRA\)_Wiki](http://qmrawiki.msu.edu/index.php?title=Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_(QMRA)_Wiki)).

As análises de risco foram conduzidas utilizando a concentração de *E.coli* (UFC/ 100 mL amostra) e os resultados da PCR para os genes associados à virulência de *E.coli* diarreiogênicas em cada local de coleta. Como as concentrações de *E.coli* encontradas em Ubatuba eram baixas, esse local de coleta não foi avaliado na análise de risco.

4.5.3 Identificação do perigo microbiológico

Os valores de concentração mínima, média e máxima de *E.coli* (UFC/100 mL) presente em cada local de coleta foram multiplicados pela porcentagem de genes associados à virulência de *E.coli* amplificados nos isolados de cada local de coleta, visando determinar a concentração de *E.coli* patogênica (Equação 1 e Apêndice 1D.1 e 1D.2).

$$[E.coli \text{ _ Patogênica}] \rightarrow [E.coli \text{ _ por _ local _ de _ amostra}] \times \% \text{ genes _ associados _ à _ virulência} \quad \text{Equação (1)}$$

Nota: [*E.coli* Patogênica] = Concentração de *E.coli* patogênica

[*E.coli* por local de amostra] = Concentração de *E.coli* por local de amostra

4.5.4 Avaliação da exposição

A ingestão oral (I_{oral}) de água foi determinada de acordo com dados da literatura, nos quais utilizou-se a distribuição gamma (r, λ) e volume de água ingerido (mL) por homens,

mulheres e crianças. Para homens: (I_{oral}) = $G\{r = 0,45; \lambda = 60; 27 \text{ mL}\}$, para mulheres encontram-se (I_{oral}) = $G\{r = 0,51; \lambda = 35; 18 \text{ mL}\}$ e para crianças os dados observados são: $I_{oral} = G\{r = 0,58; \lambda = 55; 31 \text{ mL}\}$ (SCHETS; SCHIJVEN; HUSMAN, 2011).

Para conduzir a análise de risco, o grau de incerteza foi minimizado através do método de Monte Carlo, o qual trabalha com 10.000 amostragens aleatórias de cada evento e a partir disso calcula-se um intervalo de confiança de 95% (SCHETS; SCHIJVEN; HUSMAN, 2011).

A distribuição do número de *E.coli* ingerida por evento marinho foi obtida através da multiplicação dos resultados obtidos nas análises de volume ingerido pela distribuição das concentrações (Apêndice 1D.3).

O passo seguinte foi calcular a dose de exposição (D_{exp}) como uma probabilidade de água ingerida (I_{oral}) durante um evento marinho em combinação com a concentração de *E.coli* patogênica encontrada no tempo da exposição (SCHETS; SCHIJVEN; HUSMAN, 2011), a qual pode ser visualizada na equação 2:

$$D_{exp} \rightarrow I_{oral} \times C_{E.coli} \quad \text{Equação (2)}$$

4.5.5 Avaliação da dose-resposta- Probabilidade de doença por evento marinho

A probabilidade de doença por evento marinho foi estimada de acordo com o modelo Beta-Poison proposto pela U.S *Food and Drug Administration* para *E.coli*, o qual está representado na equação 3. No modelo Beta-Poison assume-se que um único organismo é suficiente para causar a infecção (HAAS et al., 2000). Onde, P_{ill} é a probabilidade de doença de uma única cepa de *E.coli* durante evento recreacional. Valores para α e β neste estudo são 0,49 e $1,89 \times 10^5$, respectivamente, os quais foram estimados por Haas et al. (2000) a partir de *E. coli* O157: H7 como organismo modelo.

$$P_{ill} \rightarrow 1 - \left(1 + D_{exp} / \beta\right)^{-\alpha} \quad \text{Equação (3)}$$

$\beta = N_{50}/2^{1/\alpha} - 1$ e N_{50} é a dose infecciosa média, que poderia infectar metade da população.

α = parâmetro de inclinação e sua magnitude indica a proximidade do modelo Beta-Poison ao modelo exponencial (HAAS et al., 2000).

4.5.6 Simulação do pior cenário possível

Para simular o pior cenário possível utilizou-se a concentração máxima de *E.coli* permitida em águas destinadas a recreação de contato primário (800 UFC/ 100 mL), de acordo com a resolução Conama n° 274/2000 (BRASIL, 2000) e a média da porcentagem de genes

associados à virulência detectados nas amostras da Baixada Santista e no Canal de São Sebastião, e ambos resultados foram multiplicados.

Prosseguiu-se com as análises de exposição e avaliação da dose-resposta da mesma forma utilizada nos isolados da Baixada Santista e no Canal de São Sebastião (Apêndice 1D.4).

4.6 Análise estatística

Foi empregado o teste do qui-quadrado para avaliar se havia relação entre:

- resistência a antibióticos e local de coleta, com a hipótese nula de que não haveria associação entre isolado resistente aos antibióticos e local de coleta e a hipótese alternativa é que haveria associação (d.f = 12; p significativa $\leq 0,05$)
- grupos filogenéticos, metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e local de coleta, com a hipótese nula de que não haveria associação entre grupo filogenético e local de coleta e a hipótese alternativa é que haveria associação (d.f = 6; p significativa $\leq 0,05$)
- grupos filogenéticos, metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e resistência a antibióticos, com a hipótese nula de que não haveria associação entre isolado pertencente a um determinado grupo filogenético e resistência aos antibióticos e a hipótese alternativa é que haveria associação (d.f 18; p significativa $\leq 0,05$)

5 RESULTADOS

5.1 Análises microbiológicas

5.1.1 Reisolamento de *E.coli* e confirmação da identidade bioquímica

Todos os 99 isolados de *E.coli* identificados presuntivamente nos meios seletivos (*Mac Conkey* e EMB) apresentaram um perfil bioquímico característico de *E.coli* (reações de Indol e Vermelho de Metila positivos, *Voges Proskauer* e Citrato negativos).

5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Entre os 99 isolados de *E. coli* testados, 19 foram resistentes à ampicilina (AMP), 14 ao sulfametoxazol-trimetropima (SUT) e 17 à tetraciclina (TET). Não observou-se resistência aos demais antibióticos avaliados (AMC, AMI, CTX, CRX, CIP, CLO, IPM e PPT). Em Ubatuba, entre 20 isolados, observou-se 1 resistente à AMP (5%), 2 resistentes ao SUT (10%) e 4 resistentes a TET (20%). Na Baixada Santista, entre 30 isolados 10 foram resistentes a AMP (33%) e 7 ao SUT e TET (23%). A resistência observada nos isolados do Canal de São Sebastião (C) foi: 8 isolados resistentes a AMP (16%), 5 resistentes a SUT (10%) e 6 a TET (12%) do total de 49 isolados (Figura 4 e Apêndice 2A, 2B e 2C).

Nos isolados resistentes da Baixada Santista, 2 apresentaram multirresistência a 2 antibióticos (AMP + SUT e AMP + TET) e 5 foram multirresistentes aos três antibióticos (AMP + SUT + TET). Já nos isolados do canal de São Sebastião a multirresistência a dois antibióticos foi observada em 4 isolados (1 AMP + TET e 3 AMP + SUT) e em 2 isolados observou-se multirresistência a AMP + SUT + TET. Em Ubatuba apenas observou-se multirresistência à 2 antibióticos em 2 isolados (AMP + TET e SUT + TET) (Apêndice 2A, 2B e 2C).

Ao aplicar o teste do qui-quadrado (χ^2) com grau de liberdade igual a 12 (d.f) não foi observada relação entre resistência aos antibióticos e local de coleta ($\chi^2 = 13.7543$; d.f = 12; $p = 0.3167$).

Figura 4 - Frequência observada (%) de resistência aos antibióticos em *E.coli* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo (Ubatuba n=20, Baixada Santista n=30 e canal de São Sebastião n=49)

Nota: AMP= Ampicilina, SUT= Sulfametoxazol-Trimetropima e TET= Tetraciclina.

5.3 Grupos filogenéticos de *E.coli*

Os resultados e a comparação dos grupos filogenéticos de *E.coli* por duas metodologias diferentes estão representados nas seções 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3.

5.3.1 Determinação do grupo filogenético pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Um esquema do gel de eletroforese obtido para o grupo filogenético empregando os genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* por *simplex* PCR está representado na figura 5.

Todos os grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 e D) foram detectados neste estudo. Em Ubatuba, as frequências observadas de cada grupo e subgrupo foram: 55% do grupo A (A_0 40% e A_1 15%), B1 (15%), 5% do grupo B2 (subgrupo B_{2_3}) e 25% do grupo D (subgrupos D_1 15% e D_2 10%). Na Baixada Santista 63% dos isolados pertenceram ao grupo filogenético A (30% subgrupo A_0 e 33% subgrupo A_1), 13% ao B1, 7% ao grupo B2 (subgrupo B_{2_3}) e 16% ao grupo D (subgrupo D_1 13% e D_2 3%). Nos isolados do Canal de São Sebastião observou-se as seguintes frequências dos grupos filogenéticos: 69% A (subgrupos A_0 : 51% e A_1 : 18%), B1 (8%), 4% B2 (B_{2_2} 4% e B_{2_3} 4%) e 18% D (subgrupo D_1) (Tabela 5).

As reações de *simplex* PCR que amplificaram para algum dos genes foram repetidas por *triplex* PCR, as quais apresentaram similaridade em 70% dos casos (Apêndice 3A, 3B e 3C). Dessa forma, na discussão dos resultados foram analisados apenas os dados obtidos pelo *simplex* PCR. Os grupos filogenéticos detectados por essa metodologia não relacionaram-se com os locais de coleta ($\chi^2 = 1,97$; d.f = 6; $p = 0.9224$).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do *simplex* PCR dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* isolada de Ubatuba (n=20)

Nota: Gene *chuA*, 279 pb (círculo azul).
 Gene *yjaA*, 211 pb (círculo laranja).
 Gene *TspE4.C2*, 152 pb (círculo verde).
 Controle negativo para todos os genes: *E.coli* 25922 (ATCC)
 Controle positivo para o gene *chuA* e *TspE4.C2*: *E.coli* O157:H7
 Controle positivo para o gene *yjaA*: *E.coli* 35401 (ATCC)
 M= marcador de 1Kb da Invitrogen

Tabela 5 - Frequência (%) dos grupos A, B1, B2 e D e subgrupos filogenéticos (A₀, A₁, B2₂, B2₃, D₁ e D₂) de *E.coli*, identificados por *simplex* PCR nos isolados de Ubatuba, Baixada Santista e do Canal de São Sebastião de acordo com a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e identificação por subgrupo proposta por Escobar-Páramo et al., (2004)

Grupo filogenético	Subgrupo	Locais de coleta e frequência (%) de cada grupo e subgrupo filogenético		
		Ubatuba	Baixada Santista	Canal de São Sebastião
A	A ₀	40	30	51
	A ₁	15	33	18
B1	B1	15	13	8
B2	B2 ₂	0	0	4
	B2 ₃	5	7	4
D	D ₁	15	13	18
	D ₂	10	3	0

5.3.2 Determinação do grupo filogenético pela metodologia de Clermont et al. (2013)

De acordo com o perfil bioquímico supracitado e a metodologia de Clermont et al. (2013) todos os nossos isolados foram confirmados como *E.coli*, uma vez que nenhum dos isolados foi negativo para todos os genes em conjunto (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 e *arpA*), o que poderia indicar a presença de *Escherichia fergusonii*. Neste trabalho não foram observados isolados pertencentes aos clados II, III, IV ou V.

Nesta nova metodologia observou-se perfis filogenéticos diferentes (Figura 6A, 6B, 6C e 6D e Apêndice 4A, 4B e 4C) daqueles empregando a metodologia proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

Entre os isolados originados em Ubatuba 20% dos isolados foram classificados nos grupos A, e D, 15% em B1, B2 e clado I, 10% dos isolados representaram o grupo F, 5% dos isolados tiveram um perfil desconhecido (U). Nenhum dos isolados de Ubatuba pertenceu aos grupos filogenéticos C e E (Figura 6 A e Apêndice 4A). Na Baixada Santista as frequências observadas dos grupos foram: A (23%), B1 (3%), B2 (13%), D (27%), F (10%) e clado I (23%). Nenhum dos isolados da Baixada Santista foi classificado no grupo E, C ou tiveram um perfil desconhecido (U) (Figura 6 B e Apêndice 4B). Os isolados do Canal de São Sebastião tiveram o seguinte perfil genotípico: 4% grupos A e perfil desconhecido (U), 10% grupos B1 e B2, 33% grupo D, 8% grupo E, 18% grupo F, 12% clado I e nenhum pertenceu ao grupo C (Figura 6C e Apêndice 4C). Os resultados da somatória de isolados de todas as áreas agrupadas podem ser vistos na figura 6D. Analisando os resultados obtidos pela metodologia de Clermont et al. (2013), verificou-se que os grupos filogenéticos não tiveram

relação com os locais de coleta ($\chi^2 = 18,906$; d.f = 16; $p = 0.2736$) de acordo com as análises estatísticas realizadas.

Figura 6 - Frequência (%) dos grupos filogenéticos observados em cada região de coleta de acordo com a metodologia de Clermont et al. (2013)

5.3.3 Comparação das metodologias para análise dos grupos filogenéticos de *E.coli*

Os resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* obtidos pelas metodologias de Clermont; Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013) estão representados nas tabelas 6A, 6B e 6C.

Tabela 6A - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas de Ubatuba utilizando duas metodologias diferentes

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 01	A	A
ECO 02	D	F
ECO 03	A	D
ECO 04	A	A
ECO 05	A	A
ECO 06	A	D
ECO 07	A	Clado I
ECO 08	A	Clado I
ECO 09	A	D
ECO 10	A	B1
ECO 11	D	B2
ECO 12	D	D
ECO 13	B1	B1
ECO 14	A	A
ECO 15	D	F
ECO 16	A	Clado I
ECO 17	B1	U
ECO 18	B2	B2
ECO 19	D	B2
ECO 20	B1	B1

Tabela 6B - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas da Baixada Santista utilizando duas metodologias diferentes

(continua)

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 21	A	Clado I
ECO 22	A	A
ECO 23	B1	B1
ECO 24	D	D
ECO 25	B2	B2
ECO 26	D	F
ECO 27	D	F
ECO 28	A	A

Tabela 6B - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas da Baixada Santista utilizando duas metodologias diferentes

(continuação)

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 29	A	Clado I
ECO 30	A	Clado I
ECO 32	A	A
ECO 33	A	A
ECO 34	A	Clado I
ECO 35	A	D
ECO 36	A	A
ECO 37	D	F
ECO 38	A	A
ECO 39	A	D
ECO 40	A	D
ECO 41	B1	B2
ECO 42	D	B2
ECO 43	A	Clado I
ECO 44	A	Clado I
ECO 45	A	A
ECO 46	B1	D
ECO 47	A	D
ECO 48	A	Clado I
ECO 49	B2	B2
ECO 50	A	D
ECO 51	B1	D

Tabela 6C - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas do Canal de São Sebastião utilizando duas metodologias diferentes

(continua)

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 52	A	Clado I
ECO 53	A	B2
ECO 54	A	D
ECO 55	B2	U
ECO 56	B2	B2
ECO 57	A	Clado I
ECO 58	A	D
ECO 59	A	D
ECO 60	A	D

Tabela 6C - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas do Canal de São Sebastião utilizando duas metodologias diferentes

(continuação)

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 61	A	D
ECO 62	A	B1
ECO 63	A	D
ECO 64	A	B1
ECO 65	A	Clado I
ECO 66	A	D
ECO 67	A	D
ECO 68	A	Clado I
ECO 69	A	A
ECO 70	A	B1
ECO 71	A	D
ECO 72	A	E
ECO 73	D	D
ECO 76	B1	E
ECO 77	A	Clado I
ECO 78	A	A
ECO 79	B1	D
ECO 80	A	B2
ECO 81	A	B1
ECO 82	B1	E
ECO 83	B1	D
ECO 84	A	B1
ECO 85	A	D
ECO 86	A	Clado I
ECO 87	A	B2
ECO 88	A	F
ECO 89	A	U
ECO 90	A	F
ECO 91	A	F
ECO 92	D	F
ECO 93	D	F
ECO 94	D	B2
ECO 95	D	F
ECO 96	D	F
ECO 97	D	F
ECO 98	D	F
ECO 99	A	D
ECO 100	A	D

Tabela 6C - Resultados dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas do Canal de São Sebastião utilizando duas metodologias diferentes

(continuação)

Isolado	Grupo filogenético (CLERMONT; BONACORSI e BINGEN, 2000)	Grupo filogenético (CLERMONT et al., 2013)
ECO 101	A	E
ECO 102	D	D

5.4 Resistência aos antibióticos e grupos filogenéticos de *E.coli* pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Dos isolados que foram resistentes à AMP, 3 pertenceram ao grupo filogenético A e 2 ao grupo B1. A resistência ao SUT foi detectada em 1 isolado do grupo A; resistência a TET foi observada em 4 isolados do grupo A, 1 do grupo B1 e 2 do grupo D; multirresistência ao AMP + SUT foi detectada em 4 isolados do grupo A; multirresistência a AMP + TET foi detectada em 2 isolados do grupo A e em 1 isolado do grupo D; já a multirresistência a AMP + SUT + TET foi detectada em 4 isolados do grupo A e em 1 isolado do grupos B1, B2 e D; por último a multirresistência a SUT + TET foi detectada em 1 isolado do grupo A (Figura 7).

Figura 7 – Porcentagem de isolados resistentes a antibióticos em cada grupo filogenético de *E.coli* (A, B1, B2 e D) utilizando a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) (em relação ao total de 99 isolados analisados)

Nota: Ampicilina (AMP); Sulfametoxazol- Trimetropima (SUT); Tetraciclina (TET); Ampicilina + Sulfametoxazol- Trimetropima (AMP/SUT); Ampicilina + Tetraciclina (AMP/ TET); Ampicilina + Sulfametoxazol- Trimetropima + Tetraciclina (AMP/ SUT/ TET) e Sulfametoxazol- Trimetropima + Tetraciclina (SUT/ TET).

5.5 Detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica

Os genes *stx2*, *aggR*, *lt* e *invE* não foram detectados em nenhum dos isolados avaliados. Os resultados da detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica podem ser observados na tabela 7 e Apêndice 5A, 5B e 5C. Entre 20 isolados de Ubatuba os genes *astA* e *bfpA* foram detectados em 15 e 5%, respectivamente. Nos isolados da Baixada Santista observou-se os genes: *esth* (3%) e *astA* (30%), enquanto no canal de São Sebastião foram detectados *stx1* (2%), *eae* (4%), *estp* (2%) e *astA* (47%).

Tabela 7 - Número de isolados apresentando genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica e frequência (%) de detecção por PCR nos isolados de Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião, estado de São Paulo, Brasil

<i>Local de coleta</i>	<i>No. de isolados</i>	Genes					
		<i>stx1</i>	<i>eae</i>	<i>estp</i>	<i>esth</i>	<i>astA</i>	<i>bfpA</i>
Ubatuba	20	0	0	0	0	3 (15)	1 (5)
Baixada Santista	30	0	0	0	1 (3)	9 (30)	0
Canal de São Sebastião	49	1 (2)	2 (4)	1 (2)	0	23 (47)	0
Total	99	1	2	1	1	35	1

5.6 Análise do risco microbiológico da presença de *E.coli* diarreio gênica em áreas destinadas a recreação de contato primário, utilizando a metodologia AQRM

Os valores de concentração de *E. coli* menores do que 1 (<1) foram assumidos como 0,99 para a avaliação do risco microbiológico. Os resultados da PCR dos genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica dos isolados de Ubatuba não foram considerados na análise de risco porque as concentrações mínima, média e máxima de *E.coli* (UFC/ 100 mL) nesse local de coleta foram muito baixas (Tabela 8), assim conduziu-se a análise de risco apenas para os isolados coletados na Baixada Santista e no canal de São Sebastião.

Tabela 8 – Concentrações mínima, média e máxima de *E.coli* (UFC/100 mL) em amostras obtidas na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião

Local de coleta	Concentração de <i>E.coli</i> UFC/ 100 mL		
	Mínima	Média	Máxima
Ubatuba	0,99	0,99	1
Baixada Santista	0,99	154	912
Canal de São Sebastião	0,99	7,84	86

O risco de doença por *E.coli* foi maior na Baixada Santista comparado ao canal de São Sebastião (95% percentil = $2,86 \times 10^{-4}$ para homem, $1,90 \times 10^{-4}$ para mulher e $3,43 \times 10^{-4}$ para criança na Baixada Santista; $4,29 \times 10^{-5}$ para homem, $2,83 \times 10^{-5}$ para mulher e $4,90 \times 10^{-5}$ para criança no canal de São Sebastião). Mas os riscos detectados na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião do que o obtido para o pior cenário possível (95% percentil = 8×10^{-4} para homem, $5,42 \times 10^{-4}$ para mulher e $8,73 \times 10^{-4}$ para criança (baseado na concentração máxima permitida de *E.coli* para que a praia seja considerada própria (800 UFC/ 100 mL) para banho e assumindo que teria 43% de genes associados à virulência (Tabela 9).

Tabela 9 – Risco de doença para homens, mulheres e crianças (intervalo de confiança de 95%) ocasionado por *E.coli* diarreiogênicas isoladas em amostras de água do mar na Baixada Santista, no Canal de São Sebastião e no pior cenário

Local de coleta	Intervalo de confiança 95%		
	Homem	Mulher	Criança
Baixada Santista	$2,86 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-4}$	$3,43 \times 10^{-4}$
Canal de São Sebastião	$4,29 \times 10^{-5}$	$2,83 \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^{-5}$
Resolução Conama nº 274/2000	8×10^{-4}	$5,42 \times 10^{-4}$	$8,73 \times 10^{-4}$

A figura 8 mostra o risco de doença por *E.coli* diarreiogênicas associado a eventos recreacionais em ambientes marinhos na Baixada Santista e no canal de São Sebastião. Comparando com o pior cenário possível (onde 800 UFC/ 100 mL de *E.coli* exibiria 43% de genes associado à virulência), os riscos de doença encontrados na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião foram menores (BRASIL, 2000).

Figura 8 – Gráfico representando o risco de doença causada por *E.coli* diarreioigênica entre grupos de banhistas na Baixada Santista e do Canal de São Sebastião, estimado com base na quantidade de *E. coli* (UFC/100mL) e de cepas apresentando genes de virulência em amostras obtidas de cada local. O risco de doença no pior cenário (em verde) foi baseado na concentração máxima permitida de *E.coli*, de acordo com a Resolução Conama n° 274 de 2000, e na porcentagem média de genes de virulência de *E.coli* encontrados nas amostras da Baixada Santista e no Canal de São Sebastião. Cada caixa representa o valor de quartil inferior, mediano e quartil superior (25%, 50% e 75%, respectivamente) da distribuição, onde as extensões 1,5 x (valor percentil de 75% - valor percentil de 25%) estão no final de cada caixa

6 DISCUSSÃO

E. coli é comumente usada como indicador da qualidade de água para consumo humano e recreacionais (BRASIL, 2000). Sua presença na água indica poluição fecal, pois esta espécie é frequente como parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente e do homem (NATARO; KAPER, 1998). No entanto, *E. coli* não é apenas um organismo comensal, mas determinados grupos dentro da espécie expressam diferentes fatores de virulência, podendo causar doenças diarreio gênicas e infecções extra-intestinais no homem (NATARO; KAPER, 1998).

No presente estudo, isolados de *E. coli* obtidos de água do mar foram avaliados quanto a resistência a agentes antimicrobianos, classificados em grupos filogenéticos e determinado o seu potencial patogênico pela detecção de genes associados à virulência de *E. coli* diarreio gênicas.

Embora *E. coli* sobreviva pobremente na água do mar, devido a fatores como salinidade e exposição a luz ultravioleta, níveis altos desta espécie podem ser encontrados em águas marinhas onde são depositados efluentes de esgoto (CETESB, 2004; GOURMELON et al., 1997).

Os locais analisados no presente estudo representam sítios com diferentes concentrações de *E. coli*, sendo que os locais com maiores graus de atividade antropogênica (Baixada Santista, eutrófico; Canal de São Sebastião, mesotrófico) tem maiores concentrações, enquanto Ubatuba é considerado oligotrófico (BURBANO-ROSETO et al., 2011).

6.1 Resistência aos antibióticos

O primeiro fator analisado nos isolados de *E. coli* estudados foi a resistência a antibióticos. Muitos genes associados a antibióticos são codificados em elementos móveis e estes podem ser transferidos horizontalmente para organismos susceptíveis, disseminando a resistência inclusive para outras espécies, no ambiente ou no homem. Os antibióticos e os genes de resistência a essas moléculas são considerados como poluentes ambientais (MARTÍNEZ, 2009). O despejo de efluentes de esgoto no ambiente marinho pode disseminar não somente micro-organismos resistentes a agentes antimicrobianos e seus genes de resistência, mas também poderia induzir a seleção dos resistentes entre os organismos autóctones por disseminar

antibióticos usados na pecuária ou para o tratamento de doenças infecciosas no homem (MARTÍNEZ, 2009; PEI et al., 2006; TAYLOR et al., 2011).

Em ambientes menos contaminados por efluentes de esgoto ou em ambientes prístinos é normal encontrar baixa frequência de bactérias entéricas (BURBANO-ROSETO et al., 2011) e baixa resistência bacteriana aos antibióticos (MILLER; GAMMON; DAY, 2009) e essa característica foi encontrada nos isolados deste estudo, ao detectar baixa concentração de *E.coli* isolada em Ubatuba (Tabela 8) somado à menor frequência de isolados resistentes aos antibióticos (Figura 4).

Nos ambientes caracterizados por maior contaminação fecal [(Baixada Santista, eutrófico) e Canal de São Sebastião, mesotrófico)] (BURBANO-ROSETO et al., 2011) a resistência a único antibiótico e predominância de isolados resistentes à ampicilina foram mais frequentes: AMP (33%), SUT e TET (23%) na Baixada Santista e AMP (16%), SUT (10%) e TET (12%) no Canal de São Sebastião, do que em Ubatuba, ambiente mais oligotrófico (AMP 3%, SUT 10% TET 20%) (Figura 4) no entanto ao aplicar a análise estatística (teste do qui-quadrado) não observou-se diferença estatisticamente significativa na frequência de resistência a estes agentes entre os três locais de coleta ($p > 0,05$).

A maior frequência de isolados resistentes a antibióticos no ambiente com maior contaminação fecal está de acordo com dados relatados por outros autores (AL-BAHRY et al., 2009; PARVEEN et al., 1997) enquanto em ambientes com menor interferência antropogênica, observa-se baixa resistência bacteriana aos antibióticos (MILLER; GAMMON; DAY 2009).

Parveen et al. (1997) ao estudarem 765 isolados de *E.coli* de fontes pontuais e não-pontuais da Reserva Nacional de Pesquisa Estuarina Apalachicola (ANERR), relataram que a resistência a um único antibiótico foi maior (94,6%) em *E.coli* isolada de fontes pontuais (poluição oriunda de efluentes industriais e municipais) do que de fontes não pontuais, resultante de água pluviais e ressuspensão de sedimentos (67,6%).

Ainda segundo Parveen et al. (1997) a resistência de *E.coli* à ampicilina foi observada em 12,5% dos isolados obtidos de fontes pontuais e em 4,5% dos isolados de fontes não pontuais. Como explicação a esse resultado Parveen et al. (1997) sugeriram que essa ampla variação na resistência à ampicilina podia ser devido a composição de espécies bacterianas em diferentes ambientes e a troca de elementos genéticos móveis que codificam para a resistência aos antibióticos (KÜMMERER, 2009a,b; MARTÍNEZ, 2009).

Além da resistência à um único antibiótico ou especificamente à AMP, a multiressistência em conjunto com o SUT também foi maior nos locais com maior contaminação fecal (Baixada Santista e Canal de São Sebastião), mas essa característica não foi observada por Al-Bahry et al. (2009) ao analisarem 18 *E.coli* isoladas de efluentes de esgoto e água do mar do Golfo de Oman em Muscate, o quais observaram isolados resistentes à ampicilina, mas não ao SUT.

A frequência de organismos resistentes a ampicilina e a tetraciclina difere entre os estudos. No presente estudo, os maiores níveis de resistência a esses dois antibióticos foram observados nos isolados da Baixada Santista: 33% resistentes à ampicilina e 23% à tetraciclina. Frequentemente a resistência à tetraciclina é acompanhada da resistência a outro antibiótico (Kümmerer 2004a,b), e os resultados do presente trabalho vão ao encontro dessas observações, pois onze dos dezesseis isolados (61%) que foram resistentes à tetraciclina apresentaram resistência a outro antibiótico (Figura 7 e Apêndice 2A, 2B e 2C).

Maal-Bared et al. (2013) analisaram 214 *E.coli* isoladas de amostras de água, sedimento e biofilmes presentes na cabeceira de um rio na Colúmbia Britânica no Canadá, que fazia parte de uma área de agricultura intensiva com gradiente de poluição por nutrientes, e observaram 16% e 67% de *E.coli* resistentes à ampicilina e à tetraciclina, respectivamente.

No estudo conduzido por Bashir et al. (2011), amostras de *E.coli* isoladas de infecções do trato urinário de pacientes na UTI apresentaram resistência a AMP, SUT e TET de 97%, 85% e 90%, respectivamente. Devido a elevada taxa de resistência a AMP, esse antibiótico não é eficiente no tratamento de infecções do trato urinário (http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/penicilinas6.htm) e a resistência ao SUT poderia ser decorrência do fato da ampla utilização desse antibiótico em infecções desse tipo (BASHIR et al., 2011).

No presente trabalho foi detectado um total de dezessete amostras de *E.coli* resistentes ao TET (Figura 4). Esse fator também foi encontrado no estudo de Servais e Passerat (2009), analisando amostras de *E.coli* do rio Sena na França. Estes autores detectaram 44% de amostras resistentes ao no mínimo 1 de 16 antibióticos avaliados, sendo que as resistências observadas a SUT e TET foram respectivamente: 16% e 27%. No estudo de Servais e Passerat (2009), a resistência a ampicilina não foi avaliada, mas as frequências de isolados resistentes aos demais agentes podem ser comparadas com as do presente trabalho, onde foi demonstrada resistência apenas aos antibióticos pertencentes aos grupos da penicilina (ampicilina 19%), sulfonamida

(sulfametoxazol-trimetropima 14%) e tetraciclina (17%) e não aos demais agentes testados ((AMC, AMI, CTX, CRX, CIP, CLO, IPM e PPT).

A observação de maior frequência de organismos resistentes em ambientes caracterizados por maior contaminação fecal, como observado no presente trabalho ao avaliar a frequência de resistência à ampicilina (33%) e ao sulfametoxazol-trimetropima (23%) na Baixada Santista comparada a de Ubatuba (3% AMP e 10% SUT), pode ser confirmada pelos dados obtidos em estudos avaliando ambientes mais poluídos. Amaya et al. (2012), ao analisar perfis de resistência de *E.coli* isoladas de diferentes ambientes aquáticos em León, Nicarágua, observaram 100% de resistência à AMP e ao SUT entre isolados de *E.coli* de água de poço, de estação de tratamento de esgoto e de efluente de hospital.

Altas concentrações de antibióticos na água ou em solos estão associadas a áreas com elevada atividade humana, enquanto que os ambientes prístinos têm baixas concentrações (MARTÍNEZ, 2009). Embora, a Baixada Santista seja caracterizada por elevada contaminação antrópica (ambiente eutrófico), o que foi registrada pela contagem de coliformes termotolerantes e *E.coli* (BURBANO-ROSETO et al., 2011) e pela maior resistência bacteriana aos antibióticos neste local de coleta, não foi demonstrada relação entre resistência bacteriana e local de coleta. Possivelmente, o tamanho da amostra aqui avaliada de cada um dos locais de coleta pode ter influenciado os resultados, e estudos com maior número de isolados seriam necessários.

Os dados do presente estudo sugerem que os ambientes naturais representam importantes reservatórios de genes de resistência.

Dessa forma, o lançamento de antibióticos nos ecossistemas marinhos, através de efluentes não tratados, uso indiscriminado de antimicrobianos que possibilita a exposição excessiva a esses agentes, tende a exercer forte pressão seletiva sobre a população bacteriana e favorecer a seleção de bactérias resistentes. E caso o fenótipo de resistência promova um aumento no *fitness* bacteriano, os genes tendem a se fixar na população e por processos genéticos de transferência de DNA essas bactérias resistentes podem transferir genes de resistência à bactérias patogênicas e ou sensíveis ao antibiótico, contribuindo assim para a disseminação da resistência antimicrobiana (MARTÍNEZ et al., 2009; PEI et al., 2006). O mesmo fenômeno é observado em *E. coli* comensais, que podem atuar como reservatório de genes de resistência a antibióticos e possibilitar a transferência de genes de resistência bacteriana para bactérias

patogênicas (BALDINI; CABEZALI, 1991; BIBI et al., 1999; DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; GREENE; REID, 2012; MAAL-BARED, 2013).

Portanto, os ecossistemas aquáticos têm um importante papel ecológico e evolutivo para direcionar a persistência, emergência e distribuição da resistência aos antimicrobianos (TAYLOR et al., 2011).

Assim, os antibióticos e os genes de resistência a essas moléculas são considerados como poluentes ambientais. Mas, se medidas forem tomadas para evitar o lançamento de efluentes não tratados nos ecossistemas marinhos, a quantidade de genes de resistência a antibióticos nesses ambientes pode diminuir, uma vez que com menor entrada de antibióticos a pressão seletiva é reduzida (MARTÍNEZ, 2009).

6.2 Grupos filogenéticos e comparação entre as metodologias propostas por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

No presente estudo, a análise filogenética pela análise da metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) mostrou que os grupos A (65%) e D (19%) predominaram entre os isolados de *E. coli* obtidos de ambientes marinhos (Tabela 5). Estes dados diferem dos obtidos por Duriez et al. (2001) e Clermont et al. (2008), onde os grupos A e B1 foram dominantes na população de *E. coli* comensal, ao analisarem organismos isolados da microbiota intestinal normal e de infecções clínicas de humanos.

Os estudos demonstram que enquanto no homem predominam as amostras do grupo A como comensais, o grupo D predomina entre os isolados da microbiota residente de aves (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2006). A análise dos grupos filogenéticos de *E. coli* obtidas neste trabalho, mostrou que os três ambientes aquáticos estudados (Ubatuba, Baixada Santista e Canal de São Sebastião) recebem efluentes de origem fecal humana e animal, visto que a maioria das *E. coli* isoladas pertencem ao grupo A, seguidas pelo grupo D, o que caracteriza os efluentes como de origem fecal humana e animal, respectivamente (Tabela 5).

Normalmente, no Brasil, os reservatórios municipais de abastecimento de água recebem efluentes domésticos, industriais e escoamento superficial proveniente de áreas agrícolas (AMBIENTE BRASIL, 2011). Na cidade de São Paulo os reservatórios do sistema Guarapiranga-Billings apresentam alta frequência de *E. coli* e após análises filogenéticas caracterizou-se a contaminação como oriunda de fezes de humanos e animais, respectivamente

(ORSI et al., 2007). E mesmo após 7 anos, o sistema Guarapiranga-Billings ainda sofre com a contaminação fecal, pois a média das concentrações de coliformes totais (NMP/ 100 mL) em 1 ponto da represa Billings e em três pontos do reservatório de Guarapiranga foi de 22.712 NMP/ 100 mL, considerando os quatro pontos (<http://site.sabesp.com.br/uploads/file/monitoramento/laboratorial2014/dezembro2014.pdf>).

A contribuição da contaminação gerada por efluentes de origem humana pode ainda ser confirmada pela alta prevalência do gene *chuA* entre os isolados do presente estudo. Hoffmann et al. (2001) estudando 304 *E.coli* isoladas de diferentes origens utilizando a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) propuseram que a presença do gene *chuA* poderia estar envolvida na colonização em hospedeiros humanos, indicando assim que as possíveis fontes de contaminação ambiental, em rios e águas superficiais, seria ocasionada por contaminação fecal humana. No presente trabalho, utilizando a mesma metodologia, este gene foi detectado em 6 isolados de Ubatuba, 7 da Baixada Santista e em 11 isolados pertencentes ao Canal de São Sebastião (Apêndice 4A, 4B e 4C).

As possíveis fontes gerando essa contaminação por efluentes de origem humana na Baixada Santista são a entrada de esgotos clandestinos e o lançamento de esgoto doméstico pelo emissário de Santos (ABESSA et al., 2005; MARTINS, 2005); já no Canal de São Sebastião o lançamento de esgoto doméstico é realizado por três emissários submarinos (MENDES, 2007), por último, a explicação para a contaminação presente em Ubatuba pode ser decorrência do período de coleta (dois verões) caracterizados pelo aumento de chuvas e tempestades, essas que tem como potencial promover maior resuspensão de sedimento contaminado e entrada de matéria orgânica de origem continental (GAETA et al., 1999).

No presente trabalho ao aplicar as duas metodologias para a classificação dos grupos filogenéticos de *E.coli* verificou-se perfis diferentes. De acordo com Martínez-Martínez (2011) o *triplex* PCR proposto por Clermont, Bonacorsi e Bingen em 2000 caracteriza o grupo filogenético em 80% dos casos.

A nova abordagem elaborada por Clermont et al. (2013) permitiu uma melhor diferenciação dos isolados, porque observou-se redução na frequência do grupo A, alterando de 69% para 4% nos isolados do Canal de São Sebastião, 66% para 23% nos isolados da Baixada Santista e 55% para 15% nos isolados obtidos em Ubatuba (Tabela 6A, 6B e 6C). Essa modificação na frequência de isolados pertencentes ao grupo filogenético A pode indicar uma

necessidade de repensar os artigos sobre grupos filogenéticos publicados antes de 2013, uma vez que a maioria desses estudos cita que o grupo filogenético A é o mais predominante na população de *E.coli*. Esta característica foi discutida por Bailey et al. (2010) ao analisar dados de 1.889 *E.coli* isoladas em diferentes estudos. Os autores defenderam a ideia de que os grupos A e B1 (considerados predominantes pela maioria dos artigos publicados) estavam super-representados, uma vez que após as análises de filo-grupos dessas cepas, os autores puderam concluir que a predominância era maior de isolados pertencentes aos grupos A e B2 (32% e 29,4%, respectivamente), seguidos pelos grupos B1 e D (17,9% e 20,7%, respectivamente).

Mesmo empregando-se a nova metodologia (CLERMONT et al., 2013), 5% dos isolados de Ubatuba e 4% dos isolados do Canal de São Sebastião (Figura 6) apresentaram um perfil desconhecido (U), ou seja, não puderam ser classificados em nenhum dos grupos filogenéticos, embora tenham sido enquadrados em um grupo filogenético [(B1, isolado de Ubatuba (ECO 17) e B2 (ECO 55) e A (ECO 89), isolados do Canal de São Sebastião) quando utilizou-se a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen et al. (2000) (Apêndice 4A e 4C). Esta frequência de isolados não classificados é maior do que a relatada por Clermont et al. (2013), onde apenas 1% das cepas de *E.coli* não puderam ser classificadas em um grupo filogenético. Estes autores sugeriram que esses isolados não classificados (U) podiam representar filogrupos raros na população; não seriam classificados devido ao resultado de eventos de recombinação em larga-escala, onde o doador e o receptor pertencem a diferentes filogrupos, ou em último caso esse perfil tenha sido ocasionado pela perda ou ganho gênico. Possivelmente a maior frequência de isolados não classificados entre o presente estudo, e o relatado por (CLERMONT et al., 2013) deve-se a diferenças na origem dos isolados, ambiental e de fezes de humanos obtidos de cepas da França e da Austrália, respectivamente.

Oito isolados do total de 99 (8%) que foram classificados como grupo B1 através da metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) apresentaram grupos diferentes quando analisados pela nova abordagem. Dentre esses 8 isolados, 2 não apresentaram resultados positivos para o gene TspE4.C2 pela metodologia de Clermont et al. (2013), o que resultou na classificação em grupo D (Apêndice 4B). Esses achados também foram encontrados por Clermont et al. (2013), que também observam que, em uma pequena parcela das cepas B1, o gene TspE4.C2 não foi detectado usando o novo iniciador para a PCR.

Ao analisarmos os isolados classificados nos grupos B1 (5 isolados, 5%) pela metodologia de Clermont et al. (2013), pudemos determinar que o desenho de novos iniciadores e a inclusão do gene *arpA* permitiu que esse filogruppo fosse detectado, pois pelo método de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) esses mesmos isolados não tinham apresentado amplificação positiva para nenhum dos genes, e por isso haviam sido caracterizados como grupo A (Apêndice 3A, 3B, 3C, 4A, 4B e 4C).

Dos dezenove isolados (19%) que foram classificados como grupo D pela análise de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), apenas 4 mantiveram a mesma classificação, pois 15 isolados (78%) foram classificados em outro grupo filogenético quando empregou-se a metodologia de Clermont et al. (2013). Observou-se em 14 isolados, que haviam sido classificados como grupo D pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), a ausência de amplificação para o gene *arpA*. Esse mesmo resultado também foi encontrado por Clermont et al. (2013) ao avaliar a metodologia, porém os autores observaram que sete cepas que anteriormente tinham sido classificadas como grupo D não apresentaram produtos de amplificação para o gene *arpA*. Entretanto, o resultado encontrado no presente trabalho diferiu dos achados de Clermont et al. (2013), pois observou-se frequências maiores para a não amplificação do gene *arpA* em isolados anteriormente classificados como grupo D: em 4 isolados de Ubatuba, 4 da Baixada Santista e em 7 do Canal de São Sebastião (Apêndice 4A, 4B e 4C).

No presente trabalho foram observados resultados similares aos encontrados por Clermont et al. (2013) quanto à detecção do gene *chuA* nos isolados classificados no grupo filogenético B2 pela metodologia de Clermont et al. (2000). No entanto, Mendonça et al. (2011) ao aplicar a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) detectaram a ausência de amplificação do gene *chuA* em um isolado pertencente ao grupo filogenético B2, indicando que poderia haver cepas do grupo B2 que não tinha o gene *chuA*.

A frequência de cada grupo entre os isolados do presente trabalho, utilizando a metodologia preconizada por Clermont et al. (2013), foi: A (10%), B1 (9%), B2 (12%), D (27%) e dos novos grupos C (0%), E (4%), F (14%), clado I (16%) e com perfil desconhecido (3%), o quê mostra que esse novo método permite classificar melhor os isolados de *E.coli* obtidos de águas marinhas do que oriundos de sítios de infecção, uma vez que detectou-se baixa frequência de cepas que não puderam ser classificadas dentro de um grupo específico. Iranpour et al. (2015)

aplicaram a metodologia de Clermont et al. (2013) em 140 isolados de *E.coli* obtidos de pacientes com infecção urinária, cuja as frequências dos grupos filogenéticos foram: A (0,7%), B1 (5%), B2 (39,3%), C e clado I (6,4% cada), D e grupo F (2,9% cada), E (9,3%) e com um perfil desconhecido (27,1%).

De acordo com Clermont et al. (2013) seria necessário repetir a caracterização filogenética apenas para as cepas que tinham sido classificadas como grupo A ou D, pois a maioria das cepas dos grupos B1 e B2 seria classificada corretamente. Como os autores sugerem que, quando possível, a nova metodologia deveria ser empregada para todas as cepas, neste trabalho repetiu-se a classificação para todos os isolados e observou-se que 72% dos isolados que haviam sido classificados como grupo B1 pela metodologia proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) foram classificados em grupos filogenéticos diferentes ao aplicar a metodologia proposta em 2013. Já referente ao grupo B2, observou-se alteração no filogrupo em apenas 20% dos isolados que haviam sido classificados nesse grupo pela antiga metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

Mesmo após 14 anos da publicação do *triplex* PCR e com a reformulação desse método por Clermont et al. (2013) ainda são escassos os estudos que aplicam a nova metodologia para isolados de origem ambiental, o que torna difícil discutir as relações ecológicas e a importância dos novos grupos propostos (C, E e F) e do clado I de *E.coli*.

Além de permitir conhecer melhor a estrutura populacional de *E.coli*, a determinação dos filogrupos é útil na prática clínica (BINGEN et al., 1998; BOYD; HARTL, 1998; JOHNSON; STELL, 2000; PICARD et al., 1999), uma vez que os autores sugerem que há relação entre virulência e grupo filogenético; além de fornecer um método de *screening* rápido afim de evitar o uso de cepas patogênicas em processos biotecnológicos (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000) e ter aplicação na identificação de principais fontes de contaminação fecal em ambientes aquáticos (AHMED et al., 2011; CARLOS et al., 2010; ORSI et al., 2007).

Portanto, devido a essas aplicações e importância apresentadas, a determinação dos grupos filogenéticos de *E.coli* isoladas de ambientes marinhos é essencial para conhecer as características ecológicas, perfis de virulência e gerenciamento de principais fontes de contaminação.

6.3 Grupos filogenéticos e a resistência aos antibióticos

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura ainda utiliza a metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) para a caracterização dos grupos filogenéticos. Dessa maneira, toda a associação entre resistência a agentes antimicrobianos e filogrupos de *E.coli* leva em consideração a análise dos quatros principais grupos (A, B1, B2 e D), e assim, esta abordagem foi utilizada no presente trabalho para discutir e comparar possíveis relações entre estas duas características.

No presente trabalho observou-se predominância de resistência nos isolados pertencentes aos grupos A e D (Figura 7 e Apêndice 5A, 5B e 5C). Embora, a maioria dos isolados resistentes a antibióticos pertencerem ao grupo filogenético A (Figura 7 e Apêndice 5A, 5B e 5C), conforme observado anteriormente no presente estudo, ao aplicar o teste do qui-quadrado não foi encontrada correlação entre grupo filogenético e resistência a antibióticos.

Como os grupos B2 e D são considerados mais virulentos seria energeticamente uma desvantagem para a bactéria expressar também genes de resistência antimicrobiana, processo esse caracterizado como *trade-off*, o que vai ao encontro dos resultados obtidos por Picard e Goulet (1998). Estes autores, ao estudarem isolados de UPEC (*E.coli* uropatogênica), observaram que as cepas pertencentes ao grupo filogenético B2 eram mais susceptíveis aos antibióticos quando comparadas aos grupos A, B1 e D.

Duriez et al. (2008) afirmaram que os grupos comensais A e B1 têm maiores taxas de resistência a antibióticos quando comparados aos grupos B2 e D, com exceção das cepas ST131 (grupo B2) e ST405 (grupo D) que apresentam um fenótipo de multiressistência.

A associação entre resistência e grupo filogenético A (considerado comensal) também foi observada nos trabalhos conduzidos por Johnson e Stell (2000), no qual os isolados do grupo A exibiram altos níveis de resistência a antibióticos. Esta mesma relação foi observada por Bukh et al. (2009), pois ao avaliarem 1533 *E.coli* isoladas de pacientes com bacteremia, os isolados do grupo filogenético B2 foram menos resistentes aos antibióticos comparados aos isolados dos grupos A, B1 e D.

Ao contrário do relatado por estudos com amostras clínicas, no presente trabalho, entre os isolados que foram resistentes a ampicilina e sulfametoxazol-trimetropima, apenas 1% pertenceu ao grupo B2 e 2% ao grupo D, respectivamente (Figura 7). Estes dados diferem dos relatados por

Bukh et al. (2009), que observaram que a resistência a ampicilina e sulfametoxazol-trimetropima era mais frequente nos isolados do grupo D, seguidos pelo grupo A, ao analisarem isolados obtidos de amostras clínicas.

Por outro lado, Bashir et al. (2011) ao estudarem isolados clínicos de *E.coli* uropatogênica encontraram maiores taxas de resistência a antibióticos entre isolados pertencentes aos grupos filogenéticos considerados mais virulentos, apresentando a ordem decrescente de frequência: grupo D e B2. Resultados similares foram relatados por Iranpour et al. (2015), que observaram entre *E.coli* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário que 50% dos isolados resistentes pertenciam ao grupo filogenético B2, no entanto estes autores aplicaram a metodologia de Clermont et al. (2013). A exposição frequente dos pacientes com infecção urinária aos antibióticos poderia explicar a associação entre resistência e grupos filogenéticos virulentos.

No presente trabalho o perfil de multirresistência foi mais prevalente nos isolados do grupo filogenético A, mas os isolados do grupo D não foram resistentes à ampicilina (Figura 7 e Apêndice 5A, 5B e 5C). Com relação à multirresistência a três antibióticos, Bukh et al. (2009) observaram que era mais frequente nos isolados do grupo filogenético A seguido pelo grupo B1 e que os isolados do grupo D foram mais resistentes à ampicilina e sulfametaxazol.

Assim, apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa no perfil de resistência a antimicrobianos de *E. coli* de diferentes grupos filogenéticos, os dados do presente estudo indicam o predomínio do grupo filogenético A entre os isolados resistentes a antimicrobianos obtidos de águas marinhas.

6.4 Detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênicas e relação com grupo filogenético

As populações de *E.coli* possuem uma estrutura clonal, observada pela existência de diversos fenótipos, nichos ecológicos e características de sobrevivência (SELANDER; LEVIN, 1980). Alguns estudos sugerem que as cepas patogênicas de *E.coli* derivaram de cepas comensais pela aquisição de fatores de virulência através de cromossomos ou elementos genéticos móveis, representando uma estratégia de plasticidade genômica (FINLAY; FALKOW, 1997).

As cepas de *E.coli* causadoras de diarreias são classificadas nas categorias EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, EHEC e DAEC (NATARO; KAPER, 1998; UNICEF; WHO, 2009).

Como a maioria dos autores ainda discute a importância de DAEC como causadora de diarreias, torna-se difícil encontrar trabalhos científicos que investiguem a presença dessa categoria. Dessa forma neste estudo, apenas as categorias EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e EHEC foram pesquisadas.

No presente trabalho o gene *eae* foi detectado em apenas 2 isolados (Tabela 7) do Canal de São Sebastião: 1 pertencente ao grupo B2 (ECO 56) e outro ao grupo D (ECO 73), o qual (ECO 73) também continha o gene *estp*. Dessa forma o isolado ECO 56 pode ser classificado como EPEC atípica e o isolado ECO 73 como EPEC atípica ou ETEC (Apêndice 5C). Hamilton et al. (2010) avaliaram a presença do gene *eae* em 24.493 *E.coli* isoladas de águas marinhas em Avalon Bay na Califórnia e detectaram 867 isolados como EPEC atípica, os quais apresentaram as seguintes frequências filogenéticas: B1 (70,5%), B2 (25%), A (3,2%) e D ou E (1,3%).

O gene *bfpA* foi detectado em um isolado das amostras de Ubatuba (ECO 02) pertencente ao grupo filogenético D pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e ao grupo F pela metodologia de Clermont et al. (2013). Este também continha o gene *astA*, sendo assim classificado como possível EPEC típica ou EAEC (Apêndice 5A). No entanto, testes adicionais fazem-se necessários para se obter uma confirmação da sua identidade. A baixa frequência de detecção destes genes em amostras obtidas de águas marinhas está de acordo com os dados relatados por Hamilton et al. (2010). Estes autores também avaliaram a presença de EPEC típica, pela pesquisa do plasmídeo EAF, o qual foi detectado em apenas 8 isolados entre em 24.493 isolados avaliados, o que demonstrou a baixa frequência de EPEC em isolados obtidos de água marinhas.

Nas amostras do Canal de São Sebastião foi detectado apenas um isolado (2% do total de amostras analisadas do Canal de São Sebastião) com o gene *estp* (Tabela 7), de ETEC de origem em animal (NATARO; KAPER, 1998). Este isolado foi classificado no grupo D (Apêndice 5C), indicativo de sua origem animal (DURIEZ et al., 2001). A presença de animais nas praias, combinada ao lançamento de esgoto por emissários submarinos e o ineficiente tratamento de efluentes (CETESB, 2006), os quais podem conter fezes provenientes da criação de animais suínos, poderia ser uma possível explicação para a detecção desse gene.

Já, o gene *esth* que representa a variante isolada de humanos (NATARO; KAPER, 1998) foi detectado em um isolado (3%) da Baixada Santista (Tabela 7), classificado no grupo filogenético B2, característico de isolados de infecções humanas (CLERMONT; BONACORSI;

BINGEN, 2000; JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001). A presença deste gene nesta amostra, também pode ter o elevado número de turistas durante períodos de férias e os lançamentos de esgotos, como possíveis explicações para essa detecção (CETESB, 2006).

Em um isolado do Canal de São Sebastião (Tabela 7) foi detectado o gene *stx1* (característico de STEC), classificado no grupo filogenético B2, característico de isolados de infecções humanas (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001). A detecção desse gene em amostras ambientais pode estar relacionada à capacidade de STEC sobreviver em várias condições ambientais, demonstrada pela capacidade de ocupar uma variedade de nichos ambientais (ORTH et al., 2006).

O Canal de São Sebastião é considerado uma área mesotrófica e abriga quatro emissários submarinos, três dos quais descarregam efluentes de esgotos domésticos (Araçá, Saco da Capela e Cigarras) e o quarto deles (Tebar) lança efluentes industriais (CETESB, 2007). Embora, na Baixada Santista tenha sido detectada a maior concentração de *E.coli*, foi no Canal de São Sebastião que foi detectada maior diversidade de genes associados à virulência de *E.coli* diarrreio gênicas (Tabela 7).

A baixa detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarrreio gênicas em amostras de água do ambiente marinho não é característica singular do presente trabalho, sendo já observada por Albertini (2009) e Almeida et al. (2012). Albertini (2009), ao estudar 32 isolados de *E.coli* de água de lastro e 166 isolados de água da região portuária [Porto de Belém (10); Porto de Rio Grande (29); Porto de Fortaleza (4); Porto de Santos (50); Porto de Recife (31) e Porto de Paranaguá (42)], detectou a presença de apenas 3 isolados com o gene *eae* [água de lastro (1), Porto de Santos (1) e Porto de Paranaguá (1) e 3 sendo caracterizados como EAEC [Porto de Fortaleza (2) e Porto de Santos (1)]. Apenas um isolado resultou em amplificação positiva para o fator de virulência INV (isolado de água de lastro) e dois isolados do Porto de Recife foram classificados como ETEC. Já Almeida et al. (2012) ao estudarem 32 *E.coli* provenientes de água do mar das praias Ponta d'Areia, São Marcos, Calhau e Olho d'Água em São Luís do Maranhão detectaram nove isolados com o gene *elt*, um com o gene *stx* e dois com o *aggR*.

Entretanto, diferentemente dos demais genes pesquisados, o gene *astA* não teve frequência rara entre os isolados deste estudo (Tabela 7) e a sua detecção foi predominante nos isolados obtidos da Baixada Santista (30%) e do Canal de São Sebastião (47%), ambientes caracterizados por maior contaminação fecal, enquanto que em Ubatuba (ambiente oligotrófico)

este gene foi detectado em 15% dos isolados. A elevada frequência do gene *astA* nestes ambientes contaminados por efluentes de esgoto, pode ser explicada pelo fato dos isolados de EAEC serem mais prevalentes em casos de diarreia, seguido por ETEC, EPEC e EHEC (BUERIS et al., 2007; FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013).

A amplificação do gene *astA* em combinação com genes específicos para outras categorias de *E.coli* diarreiogênica, por exemplo, no isolado ECO 02 de Ubatuba que foi classificado como EPEC típica (Apêndice 5A), deve-se ao fato desse gene ser amplamente distribuído e presente em outras cepas de *E.coli* diarreiogênicas, por exemplo em ETEC, onde 20,7 à 41% dessas cepas isoladas tanto de fezes de humanos quanto de animais possuem o gene, enquanto as incidências em EHEC, EPEC e DAEC podem ser: 88%, 22% e 13%, respectivamente (MÉNARD; DUBREUIL, 2002; SAVARINO et al., 1993), o que também foi observado por Fujioka, Otomo e Ahsan (2013) ao analisar 5 cepas de ETEC que foram positivas para *esth*, 1 positiva para *estp* e 1 para *eae*.

No presente trabalho, a detecção do gene *astA* não foi associada a nenhum grupo filogenético (Apêndice 5A, 5B e 5C). No entanto, os isolados apresentando os genes *stx1*, *esth*, *eae*, *estp* foram classificados nos grupos filogenéticos B2 ou D, embora o isolado em que *bfpA* foi detectado tenha sido reclassificado no grupo F. Os grupos B2, D e F são considerados mais virulentos e associados à *E.coli* isolada de infecções extra-intestinais (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013). Os dados estão de acordo com os relatados por Nowrouzian, Wold e Adlerberth (2005) ao estudar a microbiota intestinal de 70 crianças na Suíça observaram que o grupo B2 apresentava maior frequência de genes que codificam para fatores associados à virulência do que os demais.

Ahmed et al. (2011) ao avaliarem 200 *E.coli* isoladas da água da chuva detectaram 79 isolados com um ou mais genes associados à virulência (*cdtB*, *cvaC*, *ibeA*, *kpsMT*, *papAH*, *traT*) de ExPEC (*E.coli* causadora de infecção extra-intestinal), os quais 56% e 35% pertenciam aos grupos D e B2, respectivamente. No entanto, embora estes dois grupos sejam considerados mais virulentos, eles apresentam frequência baixa na população de *E.coli* (BINGEN et al., 1998; BUKH et al., 2009; DURIEZ et al., 2001; JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001; PICARD et al., 1993; PICARD et al., 1999).

Assim, os dados do presente estudo indicam que a maior parte das amostras de *E. coli* obtidas de águas nos locais de coleta não apresentam genes associados à virulência, com exceção

da maior prevalência do gene *astA*. Este encontra-se amplamente difundido entre diferentes grupos filogenéticos, ao contrário dos demais genes estudados, mais raros, porém restritos aos grupos B2 e D, associados ao maior potencial patogênico.

6.5 Risco microbiológico da presença de *E.coli* diarreiogênicas em áreas destinadas à recreação de contato primário

Os resultados da PCR dos genes associados à virulência supracitados foram utilizados na avaliação do risco microbiológico. Nesta análise não foram considerados os resultados obtidos nos isolados de Ubatuba, uma vez que as concentrações de *E.coli* (Tabela 8) e coliformes totais neste local de coleta estavam abaixo dos limites regulatórios máximos permitidos pela Resolução Conama n° 274/2000 (BRASIL, 2000).

Somente na Baixada Santista foi detectada concentração de *E.coli* superior ao limite máximo permitido pela legislação brasileira de 800 UFC/100 mL e pela *World Health Organization* (WHO) de 500 UFC/ 100 mL (BRASIL, 2000; WHO, 2003). Essa concentração de *E.coli* pode ser explicada devido ao perfil eutrófico da área, caracterizada pelas elevadas concentrações de coliformes totais, nitrogênio e fósforo, somada à baixa concentração de oxigênio dissolvido (ABESSA et al., 2005; CETESB, 2006, 2008).

Elevadas concentrações de indicadores microbianos são frequentemente detectadas na Baixada Santista e são geralmente atribuídas ao ineficiente tratamento de efluentes, lançamento de esgotos clandestinos, presença de emissários submarinos, os quais lançam esgoto tratado e parcialmente tratado dentro do mar, e a presença do maior porto do Brasil, o Porto de Santos (ABESSA et al., 2005; BRAGA et al., 2000; CETESB, 2006, 2008; COELHO et al., 2012).

Sabe-se que a resposta à exposição a agentes patogênicos em águas destinadas a recreação de contato primário pode variar dependendo do sexo, idade, diferenças genéticas e condições médicas pré-existentes (U.S. EPA, 2012). De acordo com Schets, Schijven e Husman (2011), a piscina é o lugar onde maiores volumes de água podem ser ingeridos, contudo neste estudo considerou-se o volume de água ingerido (I_{oral}) por banhistas (homens, mulheres e crianças) em eventos marinhos de natação.

As análises da AQRM para os genes associados à virulência mostraram que *E.coli* isolada da Baixada Santista e do Canal de São Sebastião não representam risco à recreação dos banhistas, uma vez que os riscos observados estavam abaixo da predição do pior cenário possível

(estimativa que existiria 800 UFC/ 100 mL de *E.coli* e que 43% desses isolados teriam genes associados à virulência) e abaixo dos limites regulatórios de risco de doença assumidos pela U.S. EPA de 36 casos de doença por 1000 banhistas por dia (Figura 8).

Soller et al. (2000) aplicaram a AQRM para reavaliar dados epidemiológicos oriundos dos estudos do *National Epidemiological and Environmental Assessment of Recreational* (NEEAR) que tinham sido conduzidos por Wade et al. (2006, 2008) na região dos Grandes Lagos nos Estados Unidos que estava contaminada por efluentes de esgoto tratado. Estes dados permitiram a conclusão de que os maiores riscos à saúde pública foram atribuídos a norovírus e que apenas uma pequena porção do risco global foi atribuída à *E.coli* virulenta.

Embora os isolados de *E.coli* do presente estudo não representem riscos à recreação de contato primário, deve-se considerar que a AQRM apresentada aqui não representa o risco total ocasionado pelo lançamento de efluentes em ambientes aquáticos, uma vez que nos efluentes de esgoto há centenas de outros micro-organismos e patógenos oportunistas. Estes, segundo Martínez (2008), apresentam ampla versatilidade metabólica o que permite a colonização de diversos ambientes, representando, dessa forma, um risco à saúde pública.

As características que tornam *E.coli* um bom indicador de contaminação fecal recente (elevada concentração nas fezes e baixas tolerâncias às condições de salinidade e luz ultravioleta), fazem com que alguns autores não a utilizem como indicador de qualidade das águas marinhas, optando pelo uso de enterococos, que são mais resistentes às condições desse ambiente (U.S EPA, 1986). Todavia, mesmo que *E.coli* não sobreviva por longos períodos no ambiente marinho, este organismo indica a presença de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba* e Rotavírus, que estão presentes em fezes de humanos e de animais, e podem causar infecções nos banhistas (FIELD; SAMADPOUR, 2007; WESTRELL et al., 2004).

Os mesmos locais de coleta apresentados no presente trabalho foram estudados por Burbano-Rosero et al. (2011) que verificaram que as concentrações de colifagos somáticos variavam de acordo com os níveis de impacto antropogênico. Por exemplo, na Baixada Santista estes autores encontraram alta concentração de colifagos (1,000 UFP/100mL), a qual correlacionou-se positivamente com as concentrações de *E.coli* ($r = 0.98$; $p < 0.01$) e de coliformes fecais ($r = 0.97$; $p < 0.06$).

Além disso, a presença de *E.coli* não está relacionada apenas aos impactos à saúde humana, mas alerta também para os prejuízos ambientais decorrentes da entrada de elevados níveis de nutrientes decorrentes do lançamento de esgoto, os quais contribuem para a eutrofização que promove a proliferação de algas, afetando a biodiversidade marinha e o equilíbrio ecológico desse ambiente (EPSTEIN; FORD; COLWELL, 1993). Segundo Tommasi (1987), o esgoto urbano é uma das principais causas de poluição em águas costeiras marinhas no Brasil por causa do insuficiente tratamento e condições sanitárias inadequadas. Esses problemas são evidentes na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião devido à ineficiência do tratamento de esgoto e à elevação da geração de esgoto durante os períodos de férias, devido ao elevado número de turistas (CETESB, 2006, 2008).

O impacto da contaminação por esgoto na Baía de Santos foi avaliado em sedimentos de quatro sítios adjacentes à área e observou-se que mesmo distante do ponto de lançamento de efluentes havia elevadas concentrações de metais pesados, tais como chumbo, mercúrio e níquel (ABESSA et al., 2005). Já a toxicidade desses efluentes foi avaliada em *Tiburonella viscana* e observou-se que sua sobrevivência era negativamente correlacionada à presença desses metais pesados (ABESSA et al., 2005). Além desse enriquecimento inorgânico, Braga et al. (2000) mostraram que a descarga de esgoto poderia causar enriquecimento orgânico no sedimento e que, por movimentos de ressuspensão, poderiam afetar águas distantes do ponto original.

Além das questões relacionadas à saúde pública e dos danos ecológicos, a qualidade da água é essencial para o desenvolvimento econômico da região costeira, uma vez que essas áreas são responsáveis por 90% da produção mundial de peixes (CETESB, 2005). De acordo com a Agenda 21 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, s.d.), o ambiente marinho deve ser preservado, por tratar-se de um componente essencial que permite a existência de vida na Terra e uma riqueza que oferece possibilidades para o desenvolvimento sustentável (<http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21>).

Portanto, estudos que caracterizem *E.coli* isoladas do ambiente marinho são essenciais para avaliar os possíveis impactos causados pela contaminação fecal oriunda de fontes pontuais e não-pontuais e nos fornecem informações para o manejo ambiental objetivando garantir boas condições para a recreação de contato primário, biodiversidade marinha e práticas socioeconômicas. Além disso, o monitoramento constante evita a emergência de cepas virulentas e/ou resistentes aos antibióticos.

Assim, os dados aqui apresentados demonstram claramente que, apesar das altas concentrações de *E. coli* demonstradas nas amostras de águas marinhas do canal de São Sebastião e da Baixada Santista, o uso destes locais com fins recreacionais não representa risco à aquisição de doenças causadas por *E. coli*, devido à baixa prevalência de amostras de *E. coli* apresentando genes de virulência característicos das categorias diarreiogênicas. Por outro lado, a alta concentração de *E. coli* nestes locais é indicativa de contaminação fecal, sugerindo o risco a outras doenças que podem ser veiculadas por contaminação de águas marinhas por efluentes. Maiores estudos avaliando o risco a outras doenças, pela pesquisa de outros agentes patogênicos, devem ser realizados nestes locais de atividade recreacional intensa.

7 CONCLUSÕES

- Foram detectados isolados resistentes a ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetropima entre os isolados de *E. coli* obtidos dos locais de estudo. Foi observada maior frequência de isolados resistentes aos antibióticos entre isolados de *E.coli* de amostras de água do mar da Baixada Santista, região caracterizada por maior nível de contaminação;
- Os isolados de *E. coli* obtidos das três localidades eram predominantemente pertencentes aos grupos filogenéticos A e D, caracterizados por amostras comensais de origem humana e animal, pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000); porém não apresentou grupos predominantes pela metodologia de Clermont et al. (2013);
- Foi demonstrada baixa frequência dos genes associados à virulência avaliados, com exceção do gene *astA* , detectado em 35% dos isolados de *E.coli* obtidos de água do mar; sugerindo baixo potencial patogênico das amostras avaliadas.
- Não houve relação entre grupo filogenético e susceptibilidade a antibióticos entre as amostras estudadas. Por outro lado, os genes *eae*, *estp*, *esth*, *bfpA* e *stx1* foram detectados em amostras classificadas nos grupos B2 e D, sugerindo maior potencial patogênico destes grupos.
- Não houve relação entre grupos filogenéticos, susceptibilidade a antibióticos ou detecção de genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênica e o local de coleta.
- O risco microbiológico da atividade recreativa nestas áreas, estimado com base na concentração de *E.coli* e na frequência de detecção de genes associados à virulência foi considerado baixo nos pontos de coleta no canal de São Sebastião e na Baixada Santista.
- A caracterização genotípica e fenotípica dos isolados de *E. coli* obtidos em locais com diferentes atividades antropogênicas demonstrou que estes apresentam baixo potencial patogênico. Por outro lado, como foram detectados isolados de *E.coli* resistentes aos antibióticos, pertencentes à grupos filogenéticos de maior potencial patogênico e apresentando genes associados à virulência em áreas destinadas a recreação de contato primário, órgãos de conservação ambiental e de saúde devem estar alertas, visando a conservação dos ambientes marinhos e para assegurar a saúde humana.

REFERÊNCIAS¹

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; BAUER, R. F. R.; SOUSA, E. C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 875-885, 2005.

ABDELZAHER, A. M.; WRIGHT, M. E.; ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; MILLER, G.; ELMIR, S.; NEWMAN, X.; SHIH, P.; BONILLA, J. A.; BONILLA, T. D.; PALMER, C. J.; SCOTT, T.; LUKASIK, J.; HARWOOD, V. J.; McQUAIG, S.; SINIGALLIANO, C.; GIDLEY, M.; PLANO, L. R. W.; ZHU, X.; WANG, J. D.; FLEMING, L. E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non- point source subtropical recreational marine beach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 724-732, 2010.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/penicilinas6.htm. Acesso em: 22 fev. 2015.

AHMED, W.; HODGERS, L.; MASTERS, N.; SIDHU, J. P. S.; KATOULI, M.; TOZE, S. Occurrence of intestinal and extraintestinal virulence genes in *Escherichia coli* isolates from rainwater tanks in Southeast Queensland, Australia. **Applied and environmental Microbiology**, v.77, n.20, p. 7394-7400, 2011.

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

AL-BAHRY, S. N.; MAHMOUD, I. Y.; AL-BELUSHI, K. I. A.; ELSHAFIE, A. E.; AL-HARTHY, A.; BAKHEIT, C. K. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. **Chemosphere**, v.77, p. 1534-1539, 2009.

ALBERTINI, Lílían Sauer. **Ecologia, fatores associados à virulência e diversidade de *Escherichia coli* isolados de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil**. 2009. 215 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALMEIDA, N. C.; BARROS, A. L. R.; AROUCHE, S. P.; FERRO, T. A. F.; MORAES, F. H. R.; NETO, V. M.; FIGUEIREDO, P. M. S. Detecção de enteropatógenos e teste de susceptibilidade a agentes sanitizantes de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* isoladas das praias de São Luís- Maranhão. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.3, p. 304-318, 2012.

AMAYA, E.; REYES, D.; PANIAGUA, M.; CALDERÓN, S.; RASHID, M. U.; COLQUE, P.; KÜHN, I.; MÖLLBY, R.; WEINTRAUB, A.; NORD, C. E. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p. 347-254, 2012.

¹ *De acordo com:

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

AMBIENTE BRASIL [Internet]. **Mananciais**. Disponível em: <
http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/aguas_urbanas/mananciais.html>. Acesso em: 11 fev. 2015.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological Examination. In: EATON, A.D. (Ed.). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 21 th ed, cap.9. Washington, D.C.: APHA, 2005.

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

BAILEY, J. K.; PINYON, J. L.; ANANTHAM, S.; HALL, R. M. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.9, p. 3455-3456, 2010.

BALDINI, M. D.; CABEZALI, C. B. Occurrence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from environmental samples. **Marine Pollution Bulletin**, v.22, n.10, p. 500-503, 1991.

BASHIR, S.; SARWAR, Y.; ALI, A.; MOHSIN, M.; SAEED, M. A.; TARIQ, A.; HAQUE, A. Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of uropathogenic *E.coli* isolated from Faisalabad region of Pakistan. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p. 1278-1283, 2011.

BIBI, E.; EDGAR, R.; BÉJA, O.; MELLER-HAREL, Y.; HILLEL, I. **Multidrug resistance tranportes in *Escherichia coli***. In: ROSENBERG, E (Org.). *Microbial Ecology and Infectious Disease*. Washington, D.C: ASM Press, 1999. p. 276-281.

BINGEN, E.; PICARD, B.; BRAHIMI, N.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 642–650, 1998.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G. I.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v.277, p. 1453-1461, 1997.

BRASIL. Resolução Conama n° 274, de 29 de novembro de 2000.

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1159–1165, 1998.

BRAGA, E. S.; BONETTI, C.V. D.; BURONE, L.; BONETTI FOLHO, J. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista estuarine system – Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n.2, p. 165–173, 2000.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; MIKLOS, G. V.; STEIGERWALT, A. G. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 23, p. 1–7, 1973.

BUKH, A. S.; SCHONHEYDER, H. C.; EMMERSEN, J. M. G.; SOGAARD, M.; BASTHOLM, S.; ROSLEV, P. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, p. 163-168, 2009.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p. 839-844, 2007.

BURBANO-ROSETO, E. M.; UEDA-ITO, M.; KISIELIUS, J. J.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; ALMEIDA, B. C.; SOUZA, C. P.; MARKMAN, C.; MARTINS, G. G.; ALBERTINI, L.; RIVERA, I. N. G. Diversity of somatic coliphages in coastal regions with different levels of anthropogenic activity in São Paulo State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.12, p. 4208-4216, 2011.

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

CARLOS, C.; PIRES, M. M.; STOPPE, N.C.; HACHICH, E. M.; ZATO, M. I.; GOMES, T. A. T.; AMARAL, L. A.; OTTOBONI, L. M. M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, n.161, p. 1-10, 2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *E.coli* (*Escherichia coli*). Disponível em: < www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Acesso em: 29 set. 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O145 Infections (Final Update)**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O145-06-12/index.html>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

CHEN, S.; ZHAO, S.; McDERMOTT, P. F.; SCHROEDER, C. M.; WHITE, D. G.; MENG, J. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p. 195-201, 2005.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1770 – 1772, 2004.

CLERMONT, O.; LESCAT, M.; O'BRIEN, C. L.; GORDON, D. M.; TENNAILLON, O.; DENAMUR, E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. **Environmental Microbiology**, v.10, n.4, p. 1000-1006, 2008.

CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M.; GLODT, J.; PICARD, B.; OSWALD, E.; DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 654-662, 2011.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 22th Ed. –Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, M100-S22, 2012.

COELHO, F. R.; SANTOS, A. R.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; TOMA, W.; GUIMARÃES, L. L. Caracterização da qualidade das águas dos canais de Santos (São Paulo, Brasil). **Unisanta BioScience**, v.1, n.2, p. 54-59, 2012.

COLLIGNON, P.; POWERS, J. H.; CHILLER, T. M. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p. 132-141, 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Balneabilidade – conceitos. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/Praias/18-balneabilidade>>. Acesso em 22 fev. 2015.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo - balneabilidade das praias**: séries relatórios. São Paulo: CETESB, 2004. 183p.

_____. **Qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo - balneabilidade das praias**: séries relatórios. São Paulo: CETESB, 2005. 254p.

_____. **Qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo - balneabilidade das praias**: séries relatórios. São Paulo: CETESB, 2006. 365p.

_____. **Qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo - balneabilidade das praias**: séries relatórios. São Paulo: CETESB, 2007. 294p.

_____. **Qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo - balneabilidade das praias**: séries relatórios. São Paulo: CETESB, 2011. 194p.

CRANE, M. R.; HUGUES, M.; O'HANLEY, P. D.; WALDMAN, S. A. Identification of two affinity states of low affinity receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower affinity state with guanylate cyclase activation. **Molecular Pharmacology**, v.43, p. 1073-1080, 1992.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v, 208, p. 239–241, 1965.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417 – 433, 2010.

DONNENBER, M.; KAPER, J. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.60, n.10, p. 3953-3961, 1992.

DURIEZ, P.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E.; CHAVENTRÉ, A.; ELION, J.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v.147, p. 1671-1676, 2001.

DURIEZ, P.; ZHANG, Y.; LU, Z.; SCOTT, A.; TOPP, E. Loss of virulence genes in *Escherichia coli* populations during manure storage on a commercial swine farm. **Applied and Environmental Microbiology**, v 74, p. 3935–3942, 2008.

EPSTEIN, P. R.; FORD, T. E.; COLWELL, R. R. Marine ecosystems. **Lancet**, v. 342, p. 1216–2219, 1993.

ESCOBAR- PÁRAMO, P.; GRENET, K.; Le MENAC'H, A.; RODE, L.; SALGADO, E.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; RAHIMY, M.C.; ANDREMONT, A.; DENAMUR, E.; RUIMY, R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p. 5698-5700, 2004.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; LE MENAC'H, A.; LE GALL, T.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; SKURNIK, D.; DENAMUR, E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, v.8, n.11, p. 1975-1984, 2006.

FIELD, K. G.; SAMADPOUR, M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. **Water Research**, v.41, p. 3517 – 3538, 2007.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n.2, p. 136- 139, 1997.

- FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.4, p. 272-288, 2004.
- FUJIOKA, M.; OTOMO, Y.; AHSAN, C.R. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v.92, p. 289-292, 2013.
- GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends in Microbiology**, v.4, p. 444-452, 1996.
- GAETA, S. A.; RIBEIRO, S. M. S.; METZLER, P. M.; FRANCOS, M. S.; ABE, D. S. Environmental forcing on phytoplankton biomass and primary productivity of the coastal ecosystem in Ubatuba region, southern Brazil. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 47, p. 11-27, 1999.
- GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. The thin line between gut commensal and pathogen. **Science**, v.299, n.5615, p. 1999-2002, 2003.
- GOLLER, C. C.; SEED, P. C. High-throughput identification of chemicals inhibitors of *E.coli* group 2 capsule biogenesis as anti-virulence agents. **Plos One**, v.5, n.7, p. 1-10, 2010.
- GORDON, D. M. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology, 2003.
- GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v.149, p. 3575-3586, 2003.
- GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v.10, n.10, p. 2484-2496, 2008.
- GOURMELON, M.; TOAUTI, D.; POMMEPUY, M.; CORMIER, M. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of *rpoS*-dependent effects. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 1036-143, 1997.
- GREENE, S.; REID, A. Moving targets: Fighting the evolution of resistance in infections, pets, and cancer. **American Academy of Microbiology**, p. 1-41, 2012.
- GYLES, C. L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, n.7, p. 734-746, 1992.
- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDOERFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v.23, p. 1089-1097, 1997.
- HAMILTON, M. J.; HADI, A. Z.; GRIFFITH, J. F.; ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. **Water Research**, v. 44, p. 5463-5473, 2010.
- HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. 1999. Quantative Microbial Risk Assessment, John Wiley, New York.
- HAAS, C. N.; THAYYAR- MADABUSI, A.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1748, p. 153-159, 2000.
- HERZER, P.J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T.S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.11, p. 6175-6181, 1990.

HOFFMANN, H.; HORNEF, M. W.; SCHUBERT, S.; ROGGENKAMP, A.; Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, n.3, p. 227-230, 2001.

INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E.coli*: Good, bad, & deadly. **American Academy of Microbiology**, p. 1-13, 2011.

INSTITUTO TRATA BRASIL [Internet]. **Ranking do Saneamento**. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento>. Acesso em: 11 fev. 2015.

IRANPOUR, D.; HASSANPOUR, M.; ANSARI, H.; TAJBAKHS, S.; KHAMISIPOUR, G.; NAJAFI, A.; Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. **BioMed Research International**, v.2015, p. 1-7, 2015.

JAUREGUY, F.; LANDRAUD, L.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; FRAPY, E.; GUIGON, G.; CARBONNELLE, E.; LORTHOLARY, O.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; PICARD, B.; NASSIF, X.; BRISSE, S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. **BioMed Central Genomics**, v.9, p. 1-14, 2008.

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

JOHNSON, J. R.; O'BRYAN, T. T.; KUSKOWSKI, M. A.; MASLOW, J. N. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5363–5374, 2001.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI, M. A.; SCHUBERT, S.; PRÈRE, M. F.; PICARD, B. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. **Emerging Infectious Disease**, v.11, p. 141-145, 2005.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A.; CASTANHEIRA, M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E.coli* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, n.3, p. 286-294, 2010.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DENAMUR, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.12, p. 1685-1695, 1998.

KAPER, J. B.; MELLIES, J. L.; NATARO, J. P. Pathogenicity Islands and other mobile genetic elements of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: KAPER, J. B.; HACKER, J. **Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements**. Washington, DC: ASM Press, 1999. p. 33-58.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 2, p. 5-38, 1989.

KAWAMURA-SATO, K.; YOSHIDA, R.; SHIBAYAMA, K.; OHTA, M. Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. **Japanese Journal of Infectious Disease**, v.63, n.2, p. 1113-1115, 2010.

KING, L. J. Combating the triple threat: the need for a one health approach. **Microbiology Spectrum**, n. 1, v.1, p. 1-9, 2013.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – Part I. **Chemosphere**, v.75, p. 417- 434, 2009.

_____. Part II. **Chemosphere**, v.75, p. 435-441, 2009.

LIM, K-Y.; JIANG, S. C. Reevaluation of health risk benchmark for sustainable water practice through risk analysis of rooftop-harvested rainwater. **Water Research**, v 47, p. 7273-7286, 2013.

MAAL-BARED, R.; BARTLETT, K. H.; BOWIE, W. R.; HALL, E. R. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E.coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, v.443, p. 315-323, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 2004. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, 608 p.

MARTINS, C. C. **Marcadores Orgânicos Geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho**. 215 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

MARTINS, M. T.; RIVERA, I. G.; CLARK, D. L.; OLSON, B. H. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranoside-4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3095-3100, 1992.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v.321, p. 3665-367, 2008.

_____. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v.157, p. 2893-2902, 2009.

MARTÍNEZ - MARTÍNEZ, L. Detection of phylogenetic group B1 *Escherichia coli* by multiplex PCR: Description of a new amplification pattern. **Enferm Infectious Microbiology Clinical**, v.29, n.10, p. 778-786, 2011.

MÉNARD, L-P.; DUBREUIL, J.D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.1, p.43-60, 2002.

MENDES, F. M. **Estrutura da comunidade macrozoobentônica na região de influência do Terminal Almirante Barroso (TEBAR) no Canal de São Sebastião (SP, Brasil)**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MENDONÇA, N.; CALHAU, V.; LIN, T.; BOAVENTURA, L.; RIBEIRO, G.; DA SILVA, G. J. Unusual genotype of a uropathogenic *Escherichia coli* strain assigned to the B2 phylogenetic group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 3105–3106, 2011.

MILLER, R. V.; GAMMOM, K.; DAY, M. J. Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p. 37-45, 2009.

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 3004–3009, 1995.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Agenda 21**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21>. Acesso em: 11 jan. 2015.

MOISSENET, D.; SALAUZE, B.; CLERMONT, O.; BINGEN, E.; ARLET, G.; DENAMUR, E.; MERENS, A.; MITANCHEZ, D.; VU-THIEN, H. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2459–2463, 2010.

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

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.15, p. 4691-4699, 1994.

NOWROUZIAN, F. L.; WOLD, A. E.; ADLERVERTH, I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. **The Journal of Infectious Disease**, v.191, p. 1078-1083, 2005.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. **Revista Panamericana de la Salud Pública**, v.10, p. 284-293, 2001.

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

ORTH, D.; GRIF, K.; DIERICH, M. P.; WÜRZNER, R. Prevalence, structure and expression of urease genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from humans and the environment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.209, p. 513-520, 2006.

PARVEEN, S.; MURPHREE, R. L.; EDMISTON, L.; KASPAR, C. W.; PORTIER, K. M.; TAMPLIN, M. L. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p. 2607-2612, 1997.

PEI, R.; KIM, S. C.; CARLSON, K. H.; PRUDEN, A., Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). **Water Research**, v 40, p. 2427-2435, 2006.

PICARD, B.; JOURNET-MANCY, C.; PICARD-PASQUIER, N.; GOULLET, P. Genetic structures of the B2 and B1 *Escherichia coli* strains responsible for extra-intestinal infections. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 3079-3088, 1993.

PICARD, B.; GOULLET, P. Correlation between electrophoretic types B1 and B2 of carboxylesterase B and host dependent factors in *Escherichia coli* septicemia. **Epidemiology and Infection**, v. 100, p. 51-61, 1998.

PICARD, B.; SEVALI-GARCIA, J.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infectious and Immunity**, v.67, p. 546-553, 1999.

POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D.; CAPRAIS, M.P.; GOURMELOUN, M.; Le SAUX, J.C.; Le GUYADER, F. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. **Oceans and Health**, p. 331-359, 2005.

QMRA WIKI. **Hazard identification.** Disponível em: <
http://qmrwiki.msu.edu/index.php?title=Hazard_Identification>. Acesso em: 25 fev 2015.

_____. **Quantitative Microbial Risk Assessment.** Disponível em: <
http://qmrwiki.msu.edu/index.php?title=Quantitative_Microbial_Risk_Assessment>. Acesso em: 25 fev. 2015.

RIVERA, I. N. G.; MARTINS, M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 17, p. 115-136, 1996.

RIVERA, I. N. G., PAULA, C. R., SOUZA, C. P. Microbiologia Aquática Marinha. IN: Mello, I.S. & Azevedo, J.L. Microbiologia ambiental. 2 ed. EMBRAPA, Jaguariuna, p. 619-627, 2008.

SABESP. **Monitoramento da qualidade da água.** Disponível em: <
<http://site.sabesp.com.br/uploads/file/monitoramento/laboratorial2014/dezembro2014.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

SALES, Claudiana Paula de Souza. **Diversidade de bactérias quitinolíticas isoladas em amostras de água do mar e plâncton coletadas na região costeira do estado de São Paulo**. 2009. 205 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

SCHETS, F. M.; SCHIJVEN, J. F.; HUSMAN, A. M. R. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. **Water Research**, v. 45, p. 2392- 2400, 2011.

SELANDER, R. K.; LEVIN, B. R. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science**, v.210, p. 545-547, 1980.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D.A.; WHITTAM, T. S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, UMBARGER, M. H. E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*:cellular and molecular biology. Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1987. p. 1625–1648.

SERVAIS, P.; PASSERAT, J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). **Science of the Total Environment**, v.408, p. 365-372, 2009.

SMITH, R. D.; COAST, J. Antimicrobial resistance: a global response. **Bulletin of the World Health Organization**, v.80, p. 126-133, 2002.

SOLLER, J. A.; SCHOEN, M. E.; BARTRAND, T.; RAVENSCROFT, J. E.; ASHBOLT, N. J. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non – human sources of faecal contamination. **Water Research**, v. 44, p. 4674 -4691, 2010.

TAXT, A.; AASLAND, R.; SOMMERFELT, H.; NATARO, J.; PUNTERVOLL, P. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target. **Infection and Immunity**, v.78, n.5, p. 1824-1831, 2010.

TAYLOR, N. G. H.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; BAKER-AUSTIN, C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilizing antimicrobial resistance? **Trends Ecology and Evolution**, v.26, p. 278-284, 2011.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

TOMMASI, L. R. 1979. **Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos**. 1979. 79 f. Tese (Livre-docência) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

TORRES, A. G; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, n.4, p. 825–833, 1997.

TORRES, A. G. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham e Books, Oak Park, p. 223-248, 2010.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease**, v.8, n.5, p. 508-513, 2002.

U.S. EPA. 1986. Bacteriological Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters. EPA-440/5-84-002.Cincinnati, OH:U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards.

U.S. EPA. 2012. Recreational water quality criteria. Office of water 820-f-12-058. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards.

UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Polluted runoff: Nonpoint source pollution.** Disponível em: < <http://water.epa.gov/polwaste/nps/index.cfm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

WADE, T. J.; CALDERON, R.; SAMS, E.; BEACH, M.; BRENNER, K. P.; WILLIAMS, A. H.; DUFOUR, A. P. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p. 24- 28, 2006.

WADE, T. J.; CALDERON, R.; BRENNER, K. P.; SAMS, E.; BEACH, M.; HAUGLAND, R.; WYMER, L.; DUFOUR, A. P. High sensitivity of children to swimming-associated gastrointestinal illness. **Epidemiology**, v.19, n. 3, p. 375- 383, 2008.

WALK, S. T.; ALM, E. W.; GORDON, D. M.; RAM, J. L.; TORANZOS, G. A.; TIEDJE, J.M. ; WHITTAM, T.S. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n.20, p. 6534- 6544, 2009.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.45, n.2, p. 609- 614, 1940.

WESTRELL, T., SCHONNING, C., STENSTROM, T. A.; ASHBOLT, N. J. QMRA (quantitative microbial risk assessment) and HACCP (hazard analysis and critical control points) for management of pathogens in wastewater and sewage sludge treatment and reuse. **Water Science of Technology**, v. 50, p. 23–30, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Outcome of a expert consultation, Annapolis, USA Co-sponsored by USEPA:** Protection of the human environmental water, sanitation and health series, 1999, 50p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for safe recreational water environments:** Coastal and Fresh waters, 2003, 253p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1A: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de *E.coli* diarrreio gênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e as possíveis categorias encontradas nas amostras de Ubatuba

Isolado	EHEC			EPEC típica			ETEC			EIEC		EAEC		Possível categoria
	STEC		eae	EPEC atípica		estp	astA	esth	elt	invE	aggR	astA		
	stx1	stx2		bpfA	eae									
ECO 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	EPEC típica ou EAEC	
ECO 02	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1		
ECO 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC EAEC	
ECO 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
ECO 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

0 representa ausência de amplificação

1 representa amplificação

APÊNDICE 1B: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de *E.coli* diarreio gênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e possíveis categorias de encontradas nas amostras da Baixada Santista

Isolado	EHEC STEC			EPEC típica EPEC atípica			ETEC			EIEC	EAEC		Possível categoria
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>bpfA</i>	<i>eae</i>	<i>estp</i>	<i>astA</i>	<i>esth</i>	<i>elt</i>	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	
ECO 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 41	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	ETEC
ECO 42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC
ECO 48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ECO 51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC

0 representa ausência de amplificação

1 representa amplificação

[illegible]

APÊNDICE 1C: Resultados da amplificação dos genes associados à virulência de *E.coli* diarréiogênicas na forma de matriz binária (1 e 0) e possíveis categorias encontradas nas amostras do Canal de São Sebastião

(continuação)

Isolado	(continuação)												Possível categoria	
	EHEC		EPEC típica				ETEC			EIEC		EAEC		
	STEC													
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>bpfA</i>	<i>eae</i>	<i>estp</i>	<i>astA</i>	<i>esth</i>	<i>elt</i>	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>		
ECO 90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC	
ECO 91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EAEC	
ECO 96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
ECO 97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
ECO 98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	EAEC	
ECO 101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ECO 102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		

0 representa ausência de amplificação

1 representa amplificação

APÊNDICE 1D.1: Tabela exemplificando como a concentração patogênica de *E.coli* foi determinada

Número (n) de <i>E.coli</i> por local de coleta	Concentração de <i>E.coli</i> UFC/100 mL (1)			Porcentagem de genes associados à virulência (2)	Concentração de <i>E.coli</i> patogênica = (1) x (2)		
	Mínima	Máxima	Média		Mínima (%)	Máxima (%)	Média (%)
Baixada Santista (30)	0,99	910	154	33	33	3.03E+04	5.13E+03
Canal de São Sebastião (49)	0,99	86	7,84	53	5,25E+01	4.56E+03	4,16E+02

APÊNDICE 1D.2: Concentrações mínima, máxima e mediana de *E.coli* patogênica por grupo de banhistas

Local de coleta	Concentração de <i>E.coli</i> patogênica			Grupos de banhista
	Mínima (%)	Máxima (%)	Média (%)	
Baixada Santista	33	3.03E+04	5.16E+03	Homem
	33	3.03E+04	5.16E+03	Mulher
	33	3.03E+04	5.16E+03	Criança
Canal de São Sebastião	5.25E+01	4.56E+03	4.16E+02	Homem
	5.25E+01	4.56E+03	4.16E+02	Mulher
	5.25E+01	4.56E+03	4.16E+02	Criança

APÊNDICE 1D.3: Cálculo da Dose de exposição (D_{exp}) dos banhistas à *E.coli* patogênica, de acordo com o volume de água ingerido por evento marinho e com a concentração de *E.coli* patogênica

Local de coleta	Volume de água (mL) ingerida por banhista em evento marinho (3)			Dose de <i>E.coli</i> patogênica ingerida por banhista (D_{exp}) = Concentração de <i>E.coli</i> patogênica x (3)			Grupos de banhista
	Mínima	Máxima	Média	Mínima	Máxima	Média	
Baixada Santista	0.016	140	27	0.53	4.25E+06	1.39E+05	Homem
	0.022	90	18	0.73	2.73E+06	9.29E+04	Mulher
	0.080	140	31	2.64	4.25E+06	1.60E+05	Criança
Canal de São Sebastião	0.016	140	27	0.84	6.39E+05	1.12E+04	Homem
	0.022	90	18	1.16	4.11E+05	7.49E+03	Mulher
	0.080	140	31	4.20	6.39E+05	1.29E+04	Criança

APÊNDICE 1D.4: Determinação da probabilidade de doença ocasionado por *E.coli* diarreio gênica em áreas destinadas a recreação de contato primário

Local de coleta	Risco de doença $Pill=1-(1+Dexp/\beta)-\alpha$			Grupos de banhista
	Mínimo	Máximo	Médio	
Baixada Santista	0.00019%	54%	20.88158%	Homem
	0.00026%	51%	16.87552%	Mulher
	0.00093%	54%	22.30477%	Criança
Canal de São Sebastião	0.00030%	37%	3.51471%	Homem
	0.00041%	32%	2.43453%	Mulher
	0.00149%	37%	3.96995%	Criança

$\beta = N_{50}/2^{1/\alpha} - 1$ e N_{50} é a dose infecciosa média, que poderia infectar metade da população.

α = parâmetro de inclinação e sua magnitude indica a proximidade do modelo Beta-Poisson ao modelo exponencial (HAAS et al., 2000).

APÊNDICE 2A: Resultados gerais do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de *E.coli* de Ubatuba

I = intermediário

R = resistente

[illegible]

(continua)

[illegible]

APÊNDICE 2C: Resultados gerais do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de *E. coli* do Canal de São Sebastião

(continuação)

Isolados Canal de São Sebastião	Antibióticos										
	Ampicilina (AMP)	Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC)	Amicacina (AMI)	Cloranfenicol (CLO)	Cefotaxima (CTX)	Ciprofloxacina (CIP)	Cefuroxima (CRX)	Imipenema (IPM)	Piperacilina- tazobactam (PPT)	Cotrimoxazol (SUT)	Tetraciclina (TET)
ECO 90	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 91	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
ECO 92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 93	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S
ECO 94	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 95	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 96	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
ECO 97	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 98	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 99	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 100	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECO 101	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S
ECO 102	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S

S = susceptível

I = intermediário

R = resistente

APÊNDICE 3A: Resultado do *simplex* e *triplex* PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* dos isolados de Ubatuba pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Isolado	<i>Simplex</i> PCR amplificação	<i>Triplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>simplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>triplex</i> PCR
ECO 01	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 02	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 03	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 04	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 05	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 06	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 07	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 08	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 09	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 10	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 11	<i>chuA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i> /TspE4C2	D ₂	D ₂
ECO 12	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 13	TspE4C2	TspE4C2	B1	B1
ECO 14	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 15	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 16	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 17	TspE4C2	TspE4C2	B1	B1
ECO 18	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i> /TspE4C2	B2 ₃	D ₂
ECO 19	<i>chuA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i> /TspE4C2	D ₂	D ₂
ECO 20	TspE4C2	TspE4C2	B1	B1

* Como não amplificou no *simplex* para nenhum dos marcadores filogenéticos, não foi realizado o *triplex* PCR

APÊNDICE 3B: Resultado do *simplex* e *triplex* PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* dos isolados da Baixada Santista pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

(continua)

Isolado	<i>Simplex</i> PCR amplificação	<i>Triples</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>simplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>Triples</i> PCR
ECO 21	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 22	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 23	TspE4C2	TspE4C2	B1	B2
ECO 24	<i>chuA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i>	D ₂	D ₁
ECO 25	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i> /TspE4C2	B2 ₃	D ₂
ECO 26	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 27	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 28	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 29	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 30	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 32	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 33	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 34	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 35	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 36	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 37	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 38	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 39	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 40	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 41	TspE4C2	TspE4C2	B1	B1
ECO 42	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 43	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 44	<i>yjaA</i>	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i>	A ₁	B2 ₂

APÊNDICE 3B: Resultado do *simplex* e *triplex* PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* dos isolados da Baixada Santista pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

(continuação)

Isolado	<i>Simplex</i> PCR amplificação	<i>Triplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>simplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>Triplex</i> PCR
ECO 45	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 46	TspE4C2	<i>chuA</i> / TspE4C2	B1	D ₂
ECO 47	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 48	<i>yjaA</i>	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i>	A ₁	B2 ₂
ECO 49	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i> /TspE4C2	<i>chuA</i> / <i>yjaA</i>	B2 ₃	B2 ₂
ECO 50	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 51	TspE4C2	<i>chuA</i> / TspE4C2	B1	D ₂

* Como não amplificou no *simplex* para nenhum dos marcadores filogenéticos, não foi realizado o *triplex* PCR

APÊNDICE 3C: Resultado do *simplex* e *triplex* PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* dos isolados do Canal de São Sebastião pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

(continua)

Isolado	<i>Simplex</i> PCR amplificação	<i>Triples</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>simplex</i> PCR	Grupo/ subgrupo filogenético <i>Triples</i> PCR
ECO 52	<i>yjaA</i>	<i>chuA/yjaA</i>	A ₁	B2 ₂
ECO 53	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 54	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 55	<i>chuA/yjaA/TspE4C2</i>	<i>chuA/ TspE4C2</i>	B2 ₃	D ₂
ECO 56	<i>chuA/yjaA</i>	<i>chuA</i>	B2 ₂	D ₁
ECO 57	<i>yjaA</i>	<i>nada</i>	A ₁	A ₀
ECO 58	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 59	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 60	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 61	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 62	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 63	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 64	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 65	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 66	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 67	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 68	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 69	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 70	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 71	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 72	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 73	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 76	TspE4C2	<i>nada</i>	B1	A ₀
ECO 77	<i>yjaA</i>	<i>nada</i>	A ₁	A ₀
ECO 78	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 79	TspE4C2	<i>nada</i>	B1	A ₀

APÊNDICE 3C: Resultado do *simplex* e *triplex* PCR para os grupos filogenéticos de *E. coli* dos isolados do Canal de São Sebastião pela metodologia de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

(continuação)

Isolado	<i>Simplex</i> PCR amplificação	<i>Triplex</i> PCR	Grupo/subgrupo filogenético <i>simplex</i> PCR	Grupo/ subgrupo filogenético <i>Triplex</i> PCR
ECO 80	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 81	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 82	TspE4C2	<i>nada</i>	B1	A ₀
ECO 83	TspE4C2	TspE4C2	B1	B1
ECO 84	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 85	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 86	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 87	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i>	A ₁	A ₁
ECO 88	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 89	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 90	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 91	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 92	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 93	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 94	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 95	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 96	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 97	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 98	<i>chuA</i>	<i>chuA</i>	D ₁	D ₁
ECO 99	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 100	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 101	Nenhum marcador	*	A ₀	*
ECO 102	<i>chuA</i>	<i>chuA</i> / TspE4C2	D ₁	D ₂

* Como não amplificou no *simplex* para nenhum dos marcadores filogenéticos, não foi realizado o *triplex* PCR

APÊNDICE 4A: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* de Ubatuba aplicando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

Isolados	Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)				Clermont et al. (2013)				
	Marcador filogenético			Grupo	Marcador filogenético			Grupo	
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2		<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	<i>arpA</i>	
ECO 01	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 02	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 03	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 04	—	—	—	A	—	+	—	+	A
ECO 05	—	—	—	A	—	+	—	+	A
ECO 06	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 07	—	—	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 08	—	—	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 09	—	+	—	A	+	—	+	+	D
ECO 10	—	+	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 11	+	—	+	D	+	+	+	—	B2
ECO 12	+	—	—	D	+	—	—	+	D
ECO 13	—	—	+	B1	—	—	+	+	B1
ECO 14	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 15	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 16	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 17	—	—	+	B1	—	+	+	+	U
ECO 18	+	+	+	B2	+	+	+	—	B2
ECO 19	+	—	+	D	+	+	+	—	B2
ECO 20	—	—	+	B1	—	—	+	+	B1

--- Ausência de amplificação

+ Amplificação

APÊNDICE 4B: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* da Baixada Santista aplicando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

(continua)

Isolados	Clermont, Bonacorsi, Bingen (2000)				Clermont et al., (2013)				
	Marcador filogenético			Grupo	Marcador filogenético				Grupo
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2		<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	<i>arpA</i>	
ECO 21	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 22	—	+	—	A	—	+	—	+	A
ECO 23	—	—	+	B1	—	—	+	+	B1
ECO 24	+	—	+	D	+	—	+	+	D
ECO 25	+	+	+	B2	+	+	+	—	B2
ECO 26	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 27	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 28	—	+	—	A	—	+	—	+	A
ECO 29	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 30	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 32	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 33	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 34	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 35	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 36	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 37	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 38	—	+	—	A	—	+	—	+	A
ECO 39	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 40	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 41	—	—	+	B1	+	—	+	—	B2
ECO 42	+	—	—	D	+	+	—	—	B2
ECO 43	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 44	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I

APÊNDICE 4B: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* da Baixada Santista aplicando as metodologias de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

(continuação)

Isolados	Clermont, Bonacorsi, Bingen (2000)				Clermont et al., (2013)				
	Marcador filogenético				Marcador filogenético				
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	Grupo	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	<i>arpA</i>	Grupo
ECO 45	---	---	---	A	---	---	---	+	A
ECO 46	---	---	+	B1	+	---	---	+	D
ECO 47	---	---	---	A	+	---	---	+	D
ECO 48	---	+	---	A	+	+	---	+	Clado I
ECO 49	+	+	+	B2	+	+	+	---	B2
ECO 50	---	---	---	A	+	---	---	+	D
ECO 51	---	---	+	B1	+	---	---	+	D

--- Ausência de amplificação

+ Amplificação

APÊNDICE 4C: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* do Canal de São Sebastião aplicando as metodologias de Clermont, e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

(continua)

Isolados	Clermont, Bonacorsi, Bingen (2000)				Clermont et al., (2013)				
	Marcador filogenético			Grupo	Marcador filogenético				Grupo
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2		<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	<i>arpA</i>	
ECO 52	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 53	—	—	—	A	+	+	—	—	B2
ECO 54	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 55	+	+	+	B2	+	+	+	+	U
ECO 56	+	+	—	B2	+	+	+	—	B2
ECO 57	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 58	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 59	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 60	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 61	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 62	—	—	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 63	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 64	—	—	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 65	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 66	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 67	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 68	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 69	—	+	—	A	—	+	—	+	A
ECO 70	—	—	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 71	—	—	—	A	+	—	+	+	D
ECO 72	—	—	—	A	+	—	+	+	E
ECO 73	+	—	—	D	+	—	—	+	D
ECO 76	—	—	+	B1	+	—	+	+	E
ECO 77	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 78	—	—	—	A	—	—	—	+	A
ECO 79	—	—	+	B1	+	—	+	+	D

APÊNDICE 4C: Comparação entre os resultados obtidos dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* do Canal de São Sebastião aplicando as metodologias de Clermont, e Bingen (2000) e Clermont et al. (2013)

(continuação)

Isolados	Clermont, Bonacorsi, Bingen (2000)				Clermont et al, (2013)				
	Marcador filogenético				Marcador filogenético				Grupo
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	Grupo	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4C2	<i>arpA</i>	
ECO 80	—	+	—	A	+	+	—	—	B2
ECO 81	—	—	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 82	—	—	+	B1	+	—	+	+	E
ECO 83	—	—	+	B1	+	—	+	+	D
ECO 84	—	—	—	A	—	—	+	+	B1
ECO 85	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 86	—	+	—	A	+	+	—	+	Clado I
ECO 87	—	+	—	A	+	+	—	—	B2
ECO 88	—	—	—	A	+	—	—	—	F
ECO 89	—	—	—	A	—	—	+	—	U
ECO 90	—	—	—	A	+	—	—	—	F
ECO 91	—	—	—	A	+	—	—	—	F
ECO 92	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 93	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 94	+	—	—	D	+	—	+	—	B2
ECO 95	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 96	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 97	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 98	+	—	—	D	+	—	—	—	F
ECO 99	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 100	—	—	—	A	+	—	—	+	D
ECO 101	—	—	—	A	+	—	+	+	E
ECO 102	+	—	—	D	+	—	+	+	D

--- Ausência de amplificação

+ Amplificação

APÊNDICE 5A: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada de Ubatuba

Isolado	Resistência	Grupo filogenético 2000	Grupo filogenético 2013	Genes associados à virulência amplificados	Possível categoria de <i>E. coli</i> diarréiogênica
ECO 01		A	A		
ECO 02	TET	D	F	<i>bfpA / astA</i>	EPEC típica/ EAEC
ECO 03		A	D		
ECO 04	AMP/TET	A	A		
ECO 05	SUT/TET	A	A		
ECO 06		A	D		
ECO 07	TET	A	Clado I		
ECO 08	TET	A	Clado I		
ECO 09		A	D		
ECO 10		A	B1		
ECO 11		D	B2		
ECO 12		D	D		
ECO 13		B1	B1		
ECO 14		A	A		
ECO 15		D	F		
ECO 16		A	Clado I	<i>astA</i>	EAEC
ECO 17		B1	U	<i>astA</i>	EAEC
ECO 18		B2	B2		
ECO 19		D	B2		
ECO 20		B1	B1		

AMP = Ampicilina

SUT = Sulfametoxazol-Trimetropima

TET = Tetraciclina

APÊNDICE 5B: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada da Baixada Santista

(continua)

Isolado	Resistência	Grupo filogenético 2000	Grupo filogenético 2013	Genes associados à virulência amplificados	Possível categoria de <i>E. coli</i> diarréiogênica
ECO 21		A	Clado I		
ECO 22		A	A		
ECO 23	AMP/SUT/TET	B1	B1	<i>astA</i>	EAEC
ECO 24	TET	D	D		
ECO 25	AMP/SUT/TET	B2	B2		
ECO 26	AMP/TET	D	F		
ECO 27	AMP/SUT/TET	D	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 28		A	A		
ECO 29		A	Clado I		
ECO 30		A	Clado I		
ECO 32	AMP/SUT/TET	A	A		
ECO 33	AMP/SUT/TET	A	A		
ECO 34		A	Clado I	<i>astA</i>	EAEC
ECO 35	AMP/SUT	A	D		
ECO 36	AMP	A	A		
ECO 37		D	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 38		A	A		
ECO 39		A	D		
ECO 40		A	D		
ECO 41		B1	B2	<i>esth</i>	ETEC
ECO 42		D	B2	<i>astA</i>	EAEC
ECO 43		A	Clado I		
ECO 44		A	Clado I		

APÊNDICE 5B: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada da Baixada Santista

(continuação)

Isolado	Resistência	Grupo filogenético 2000	Grupo filogenético 2013	Genes associados à virulência amplificados	Possível categoria de <i>E. coli</i> diarréiogênica
ECO 45	AMP	A	A	<i>astA</i>	EAEC
ECO 46	AMP	B1	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 47	SUT	A	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 48		A	Clado I		
ECO 49		B2	B2		
ECO 50		A	D		
ECO 51		B1	D	<i>astA</i>	EAEC

AMP = Ampicilina

SUT = Sulfametoxazol-Trimetopima

TET = Tetraciclina

APÊNDICE 5C: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada do Canal de São Sebastião

(continua)

Isolado	Resistência	Grupo filogenético 2000	Grupo filogenético 2013	Genes associados à virulência amplificados	Possível categoria de <i>E. coli</i> diarreio gênica
ECO 52	AMP/SUT/TET	A	Clado I		
ECO 53		A	B2	<i>stx1</i>	STEC
ECO 54		A	D		
ECO 55		B2	U	<i>astA</i>	EAEC
ECO 56		B2	B2	<i>eae</i>	EPEC
ECO 57		A	Clado I	<i>astA</i>	EAEC
ECO 58		A	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 59		A	D		
ECO 60		A	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 61		A	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 62		A	B1		
ECO 63		A	D		
ECO 64		A	B1		
ECO 65		A	Clado I	<i>astA</i>	EAEC
ECO 66		A	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 67		A	D		
ECO 68		A	Clado I		
ECO 69		A	A		
ECO 70		A	B1		
ECO 71		A	D		
ECO 72	TET	A	E		
ECO 73		D	D	<i>eae/ estp</i>	EPEC/ETEC
ECO 76		B1	E	<i>astA</i>	EAEC
ECO 77		A	Clado I		
ECO 78		A	A	<i>astA</i>	EAEC
ECO 79		B1	D	<i>astA</i>	EAEC

APÊNDICE 5C: Perfil fenotípico e genotípico de *E. coli* isolada do Canal de São Sebastião

(continuação)

Isolado	Resistência	Grupo filogenético 2000	Grupo filogenético 2013	Genes associados à virulência amplificados	Possível categoria de <i>E. coli</i> diarrreio gênica
ECO 80	AMP	A	B2		
ECO 81	AMP/TET	A	B1	<i>astA</i>	EAEC
ECO 82	AMP	B1	E	<i>astA</i>	EAEC
ECO 83	TET	B1	D	<i>astA</i>	EAEC
ECO 84	TET	A	B1	<i>astA</i>	EAEC
ECO 85		A	D		
ECO 86	AMP/SUT	A	Clado I	<i>astA</i>	EAEC
ECO 87	AMP/SUT/TET	A	B2	<i>astA</i>	EAEC
ECO 88		A	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 89		A	U	<i>astA</i>	EAEC
ECO 90		A	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 91	AMP/SUT	A	F		
ECO 92		D	F		
ECO 93		D	F		
ECO 94		D	B2		
ECO 95		D	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 96		D	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 97		D	F	<i>astA</i>	EAEC
ECO 98		D	F		
ECO 99		A	D		
ECO 100		A	D		
ECO 101	AMP/SUT	A	E		
ECO 102		D	D	<i>astA</i>	EAEC

AMP = Ampicilina

SUT = Sulfametoxazol-Trimetropima

TET = Tetraciclina