
DETECÇÃO DE ENTEROPATÓGENOS E TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES SANITIZANTES DE CEPAS DIARREIOGÊNICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DAS PRAIAS DE SÃO LUÍS - MARANHÃO

Nathalia Cunha Almeida,¹ André Luiz Raposo Barros,² Saulo Pereira Arouche,² Thiago Azevedo Feitosa Ferro,³ Flávio Henrique Reis Moraes,³ Valério Monteiro Neto³ e Patricia de Maria Silva Figueiredo³

RESUMO

Na cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão, é ineficaz o tratamento de efluentes, os quais são lançados *in natura* nos recursos hídricos. Isso evidencia que, no ambiente costeiro, podem existir indicadores de contaminação fecal. Amostras das praias Ponta d'Areia, São Marcos, Calhau e Olho d'Água foram analisadas com o objetivo de detectar os enteropatógenos e as linhagens diarreioagênicas de *Escherichia coli* ali presentes e, além disso, testar a susceptibilidade a agentes sanitizantes das linhagens de *E. coli* diarreioagênicas. Em todos os pontos de coleta foram identificadas espécies de *E. coli*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*, *Salmonella* spp., *Serratia* sp. As cepas de *E. coli* diarreioagênicas, identificadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), ficaram assim distribuídas: 82% de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), 9% de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e 9% de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Os agentes sanitizantes testados foram: detergente, álcool doméstico e hipoclorito de sódio. Este último apresentou maior ação bactericida sobre todas as linhagens de *E. coli*. O estudo mostrou que os problemas de saneamento local têm contribuído para a contaminação das praias de São Luís por microrganismos resistentes a agentes sanitizantes e que representam riscos à saúde pública.

DESCRITORES: *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli*. Saúde Pública.

-
- 1 Mestranda em Sustentabilidade de Ecossistemas, Universidade Federal do Maranhão (UFMA).
 - 2 Graduado em Engenharia Ambiental, Universidade Ceuma.
 - 3 Professor (a) da Universidade Ceuma.

Endereço para correspondência: Patricia M. S. Figueiredo, Rua Josué Montello, 01, Renascença II, Uniceuma Campus I, Laboratório de Microbiologia Médica. São Luís – MA. CEP: 65075-120. E-mail: figueiredo.patricia@gmail.com

Recebido para publicação em: 14/12/2011. Revisto em: 20/6/2012. Aceito em: 21/9/2012.

ABSTRACT

Enteropathogens detection and susceptibility testing to sanitizer agents of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from the beaches of São Luís, Maranhão, Brazil

The city of São Luís, capital of Maranhão state (Brazil), provides ineffective treatment of its effluents, which are released straight into the water resources. In order to search for indicators of fecal contamination at the coastal environment we collected samples from different sites. Samples from Ponta d'Areia, São Marcos, Calhau and Olho d'Água beaches were analyzed aiming to detect pathogens and diarrheagenic strains of *Escherichia coli*; in addition to test the susceptibility of diarrheagenic *E. coli* strains to sanitizer agents. In all analyzed areas, species of *E. coli*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*, *Salmonella* spp., and *Serratia* sp were identified. Strains of diarrheagenic *E. coli* were identified thorough the Polymerase Chain Reaction (PCR), 82% corresponded to enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), 9% to enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) and 9% to enteroaggregative *E. coli* (EAEC). The sanitizers tested were detergent, domestic alcohol and sodium hypochlorite, the latter presented higher bactericidal effect for all *E. coli* strains. The study showed that the local sanitation problems contributed to the contamination of the beaches in São Luís by microorganisms resistant to sanitizers which pose risks to public health.

KEY WORDS: *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli*. Public Health.

INTRODUÇÃO

O ecossistema marinho tem grande importância para a sociedade em virtude de seus possíveis usos. Assim, a qualidade da água deste ambiente é fundamental para que seus usos não acarretem prejuízos à saúde da população (Oliveira, 2009). Sales (2006) agrupa em cinco categorias os usos principais das praias, os quais refletirão na qualidade desses ambientes: uso residencial do solo, exploração dos recursos vivos e não vivos, infraestrutura, turismo e atividades recreacionais e conservação e proteção da biodiversidade.

Diversos poluentes, principalmente os originados do esgoto doméstico, são lançados no ambiente costeiro sem tratamento adequado e comprometem a qualidade deste recurso hídrico (Dalfior, 2005). A falta de saneamento constitui um dos mais sérios problemas ambientais e de saúde pública, principalmente nas áreas urbanas de países em desenvolvimento. Em decorrência do rápido e intenso crescimento populacional desses países, presume-se que o número dos indivíduos não abastecidos por água potável e sem infraestrutura de esgotamento sanitário tende a crescer e não a diminuir. Este quadro tem como origem a falta de investimentos em obras de saneamento que atendam à demanda gerada por uma população crescente (Gouveia, 1999).

O déficit no setor de saneamento básico acarreta uma série de doenças na população, tendo como consequência gastos muito elevados com a saúde pública. Entre as principais doenças relacionadas à contaminação hídrica e à falta de condições adequadas de esgotamento sanitário, destacam-se: cólera, infecções gastrointestinais, febre tifoide, poliomielite, amebíase, esquistossomose e shigelose (Motta et al., 1994).

Estudos epidemiológicos têm documentado um aumento do risco de contrair doenças gastrointestinais e respiratórias após a recreação em águas com concentrações elevadas de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) provenientes de esgoto e da drenagem urbana. Pesquisas com FIB são realizadas em todo o mundo em razão de sua presença em altas concentrações no esgoto e no escoamento superficial urbano e também porque sua detecção apresenta baixo custo e seus ensaios são padronizados (Boehm et al., 2003).

No mundo, a pneumonia e a diarreia são responsáveis por cerca de 40% das mortes de crianças a cada ano. Em escala global, a diarreia é a segunda doença causadora de maior grau de mortalidade entre crianças menores de 5 anos, pois aproximadamente 1,5 milhão de crianças morre todo ano em decorrência desta enfermidade (UNICEF & WHO, 2009).

Mais de vinte enteropatógenos virais, bacterianos e parasitários estão associados com diarreia aguda, entre os quais se destacam: Rotavírus e *Escherichia coli*, principais responsáveis pelos episódios de diarreia aguda em crianças; *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni/coli*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas* spp., que ocorrem mais comumente em áreas pobres; infecções causadas por protozoários e helmintos, presentes sobretudo em áreas onde o saneamento ambiental é bastante precário (O'ryan et al., 2005).

A *Escherichia coli* é predominante entre os diversos organismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal é formada por comensais não patogênicas, mas, caso o hospedeiro esteja debilitado ou com baixa imunidade, estas cepas podem causar infecções (Nataro & Kaper, 1998). Sua presença no meio marinho pode ser devida à contaminação microbiana de origem fecal, portanto é indicadora de condições sanitárias inadequadas (Kasnowski, 2004).

Cepas de *E. coli* diarreiogênicas são classificadas dentro de vários grupos com base nos mecanismos de patogenicidade e na presença de vários fatores ou determinantes de virulência. Nesses grupos estão incluídas *E. coli* dos tipos difusamente aderente (DAEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enterotoxigênica (ETEC) e enterohemorrágica (EHEC) (Hamilton et al., 2010).

Segundo Santos (2009) e Silva et al. (2008), a cidade de São Luís, localizada no estado do Maranhão, Brasil, possui uma estrutura de saneamento básico com baixa porcentagem de tratamento de efluentes e que atende pequena parcela da população local. A contaminação do mar pode acontecer em consequência de despejo direto de esgoto, água de drenagem pluvial já contaminada clandestinamente por lançamento de esgoto ou de deságue de rios contaminados pelas formas anteriormente citadas. Assim, há fortes evidências de que o ambiente marinho esteja susceptível à existência de FIB e, conseqüentemente, de patógenos.

Estudos feitos por Silva et al. (2008) no ano de 2005 nas praias mais frequentadas por banhistas e turistas no município de São Luís – Ponta d'Areia,

Calhau, Olho d'Água e Araçagi – concluíram que as águas destas praias apresentavam altas concentrações de *Enterococcus*, caracterizando-se como impróprias para o banho em várias períodos do ano. A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 274, de 29 de novembro de 2000, em seu Art. 2º § 5º, recomenda a pesquisa de organismos patogênicos nas praias ou balneários sistematicamente impróprios. Esta norma ainda determina que os microrganismos indicadores de contaminação fecal que devem ser pesquisados para avaliação de balneabilidade de águas marinhas são: os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* (Brasil, 2000).

Portanto, foram analisadas amostras contaminadas com coliformes termotolerantes das principais praias de São Luís, oriundas de estudos feitos por Barros et al. (2010) e provenientes das praias da Ponta d'Areia, São Marcos, Calhau e Olho d'Água. Esta investigação teve como objetivos detectar os enteropatógenos e as linhagens diarreio gênicas de *E. coli* presentes nas praias e fazer o teste de susceptibilidade das linhagens de *E. coli* a agentes sanitizantes.

É necessário que seja feita a identificação dos enteropatógenos nas águas das praias, pois eles caracterizam a contaminação dos recursos hídricos e representam riscos à saúde das pessoas que usufruem desses ambientes para recreação. Além disso, a determinação da susceptibilidade de *E. coli* diarreio gênicas a agentes sanitizantes possibilita a identificação da resistência desses organismos a substâncias que estão presentes nos esgotos domésticos e que são de fácil obtenção pelas pessoas que usufruem do ambiente marinho.

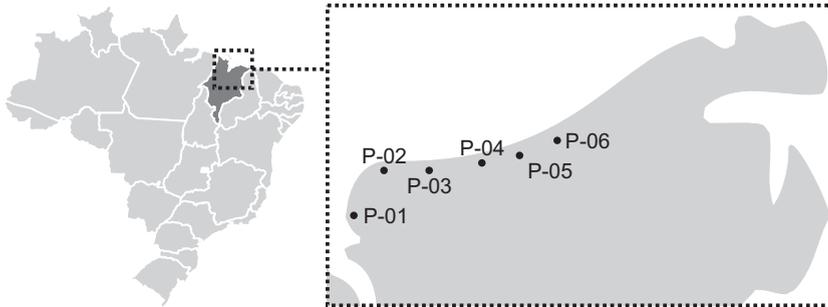
MATERIAL E MÉTODOS

A cidade de São Luís está situada no norte do estado do Maranhão, na ilha do Maranhão (Latitude 2º31' S e Longitude 44º16' W), juntamente com outros três municípios: Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa (Silva et al., 2008). Segundo dados do Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a cidade de São Luís conta com uma população de 1.011.943 habitantes em uma área de 835 km² e possui um litoral com 32 km de extensão.

Os pontos de coleta de água foram geograficamente marcados com auxílio de um GPS: dois pontos de coleta localizados na praia da Ponta d'Areia (P-01: 2º30'06.56" S / 44º19'06.76" W; P-02: 2º29'39.96" S / 44º18'28.70" W), um ponto na praia de São Marcos (P-03: 2º29'12.45" S / 44º17'04.95" W), outro no Calhau (P-04: 2º28'55.78" S / 44º15'35.01" W) e mais dois pontos na praia do Olho d'Água (P-05: 2º28'47.97" S / 44º14'15.75" W; P-06: 2º28'39.65" S / 44º13'33.50" W), totalizando seis pontos de coleta de amostras de água distribuídos numa faixa litorânea com cerca de 12 km de extensão.

Os pontos de coleta ficaram assim distribuídos: P-01 estava localizado a 500 m à direita da foz do Rio Anil, com quatro pontos de esgoto e dois de drenagem pluvial em suas proximidades; P-02 estava próximo de três pontos de esgoto e de dois

pontos de drenagem pluvial; P-03, próximo de 5 pontos de esgoto e de 27 de drenagem pluvial e a mais de 2 km de distância à esquerda do Rio Calhau; P-04 localizava-se entre os rios Calhau (500 m) e Pimenta (2 km) e possuía um ponto de esgoto e oito de drenagem pluvial em suas cercanias; P-05, entre o Rio Pimenta (400 m) e o Rio Jaguarema (400m) e perto de um ponto de esgoto e um de drenagem pluvial; P-06 ficava a 1 km à direita do rio Jaguarema e a 1 km à esquerda do Rio do Meio, com nove pontos de drenagem pluvial e nenhum ponto de esgoto em suas proximidades.



Fonte: Miranda et al. (2000) - SPOT IV (EMBRAPA) (adaptado pelo autor, 2011).

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras.

A pesquisa foi iniciada no mês de maio e finalizada no mês de novembro de 2009. No período de maio a setembro, foram identificadas as enterobactérias e, nos meses posteriores, detectadas as cepas diarreio gênicas de *E. coli*, seguindo-se a realização do teste de susceptibilidade destas cepas a agentes sanitizantes. Assim, concluídos os processos de análise laboratorial, os resultados foram tabelados e tratados por meio de proporção simples.

A coleta de dados foi realizada com base nas amostras positivas e mais diluídas de caldo *Escherichia coli* (EC) provenientes do monitoramento da qualidade da água realizado por Barros et al. (2010) nos pontos já mencionados. Assim, inoculou-se este material em tubos contendo caldo Verde Brillante e Rappaport, por meio de alça de platina, os quais foram incubados a 35,5°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Seguindo-se o método de esgotamento, foram semeadas placas contendo Ágar MacConkey nos tubos positivos de Caldo Verde Brillante. Os tubos positivos provenientes do Caldo Rappaport foram semeados em placas contendo meio Ágar *Salmonella-Shigella*. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 35,5°C durante 24 horas para posterior leitura dos resultados (Nascimento et al., 2000).

As colônias isoladas provenientes de Ágar MacConkey e Ágar *Salmonella-Shigella* foram repicadas no Enterokit B (Probac do Brasil): EPM, Mili e Citrato para realizar as provas bioquímicas para identificação de enterobactérias (Pupulin et al., 2009).

Após a identificação das enterobactérias, apenas as espécies de *E. coli* (32 isolados) foram selecionadas para a caracterização dos subtipos diarreio gênicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica tem por finalidade amplificar diferentes alvos de DNA numa mesma reação com uso de vários oligonucleotídeos, o que faz com que os custos envolvidos neste teste sejam reduzidos significativamente (Macêdo et al., 2007).

Primeiramente, as colônias de *E. coli* isoladas foram semeadas em Ágar Nutriente e, após sua incubação a 35,5°C em estufa por 24 horas, elas foram suspensas em tubo *ependorf* contendo água destilada. O conteúdo foi agitado em vórtex de acordo com a escala de MacFarland até atingir a turbidez de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e, finalmente, foi realizada a extração do DNA das bactérias pelo método de fervura em água estéril (Barea et al., 2004; Sepp et al., 1994; Lench et al., 1988), colocando-se os tubos *ependorf* em água a 100°C por 10 minutos. Após esse procedimento, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 1 minuto e o sobrenadante foi retirado para ser separado o DNA de outras partes da célula. Dessa forma, o sobrenadante foi utilizado no procedimento da PCR.

Alguns genes podem codificar fatores de virulência tais como: o fragmento de gene *eae* é característico de *E. coli* EPEC, *stx* de *E. coli* EHEC, *elt* e *est* de *E. coli* ETEC, *ipaH* de *E. coli* EIEC e *aggR* de *E. coli* EAEC. Para ser realizada a identificação de genes de virulência, é necessário que para cada um dos genes-alvo sejam utilizados diferentes oligonucleotídeos. Assim, os oligonucleotídeos SK1-SK2 foram utilizados para detectar o gene *eae*, o conjunto de oligonucleotídeos VTcom-u e Vtcom-d foram utilizados para amplificar os genes *stx1*, *stx2* e seus variantes e o conjunto de oligonucleotídeos AL65 e AL125, que amplificam dois genes da toxina ST-I (ST-Ia e ST-Ib), para detectar o gene *est*; o conjunto de oligonucleotídeos ipaIII e ipaIV, que podem detectar os genes *elt* e *ipaH*, respectivamente pares de oligonucleotídeos *aggRks1* e *aggRks2*, para detectar o gene *aggR* (Toma et al., 2003).

Além dos oligonucleotídeos, os reagentes utilizados no procedimento da PCR foram: 26,56 µL de água estéril, 10 µL de solução tampão (buffer), 0,50 µL dNTP 20 mM (nucleotídeos) e 0,50 µL de DNA polimerase Taq, DNA template (Blanco et al., 2004). A amplificação dos genes das bactérias isoladas foi realizada em Termociclador. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% e, posteriormente, corado em brometo de etídio para sua visualização no transiluminador ultravioleta (UV) (Toma et al., 2003).

O teste de susceptibilidade a agentes sanitizantes seguiu a metodologia das diluições sucessivas em que 3 mL do agente foi diluído sequencialmente em cinco tubos contendo 3 mL de meio de cultura: a primeira diluição de 1/2 tinha 1,5 mL do agente diluído; 0,375 mL do agente estava contido na segunda diluição de 1/4; 0,047 mL na terceira diluição de 1/8; 0,0029 mL na quarta diluição de 1/16 e 0,000092 mL na última diluição de 1/32. As colônias de bactérias (suspensas em solução salina homogeneizada até obter uma turbidez de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala

McFarland) foram inoculadas em cada uma dessas diluições. Assim, foi possível verificar se o agente tinha poder bactericida, bacteriostático ou se a bactéria crescia com a ação do sanitizante (Xavier et al., 2007). Apenas as cepas diarreio gênicas de *E. coli* que foram detectadas neste estudo, 11 estirpes, foram submetidas a testes de susceptibilidade aos seguintes agentes sanitizantes: duas marcas de detergente, uma marca de álcool doméstico e duas marcas de hipoclorito de sódio.

RESULTADOS

Por meio dos testes bioquímicos, foram detectadas 40 espécies de bactérias entéricas, dentre elas *E. coli* (32), *Serratia liquefaciens* (2), *Serratia sp.* (1), *Hafnia alvei* (3) e *Salmonella spp.* (1). A primeira espécie foi encontrada em todos os pontos de coleta de amostras e teve maior frequência em comparação com as outras espécies (Figura 2).

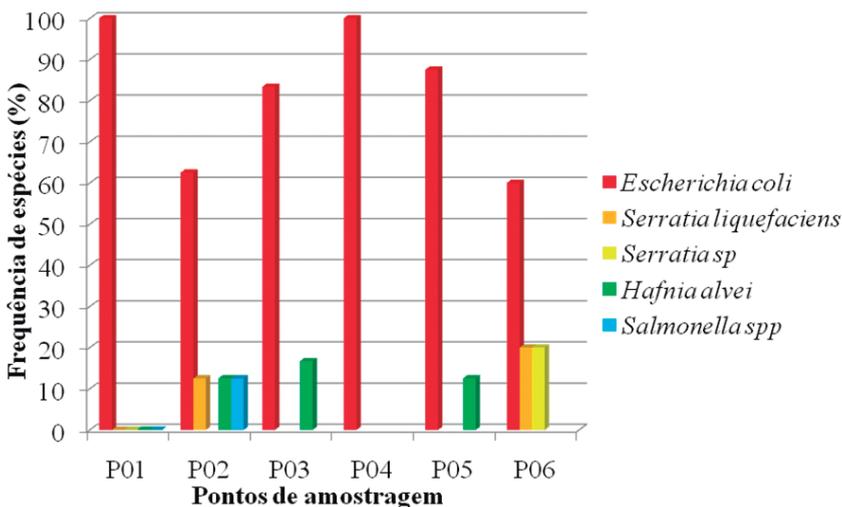


Figura 2. Frequência de microrganismos isolados nos seis pontos de coleta, relacionando-se a presença de *E. coli* com outros microrganismos.

Realizou-se o teste apenas com espécies de *E. coli* estocadas para saber quais cepas abrigavam genes de virulência que representariam riscos à saúde da população que frequenta as praias de São Luís.

Os genes detectados nesta pesquisa foram *stx*, *elt* e *aggR*, que são característicos de cepas de *E. coli* EHEC, ETEC e EAEC, respectivamente. A linhagem ETEC identificada é produtora da toxina LT (Figura 3).

Neste estudo, foram identificados três tipos de cepas diarreio gênicas de *E. coli*: enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC) e enterohemorrágica (EHEC). O maior número de estirpes encontradas era do primeiro tipo.

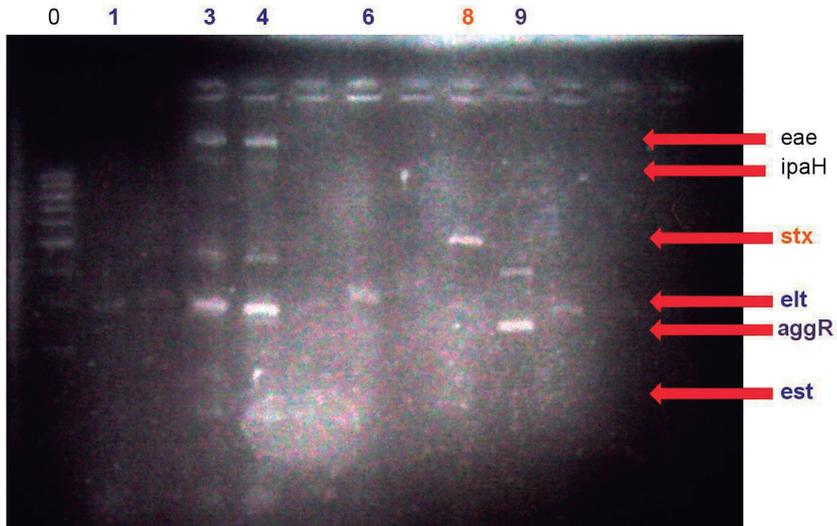


Figura 3. Resultado de teste de PCR para amplificação de fragmento de DNA da amostra de *E. coli*. Descrição: 0, DNA ladder 100-bp; 1 (ETEC); 3 (ETEC); 4 (ETEC); 6 (ETEC); 8 (EHEC); 9 (EAEC).

Somente nos pontos P-03 e P-06 não foram detectadas cepas de *E. coli* diarreio gênicas. No ponto P-01, foi identificada uma cepa de EAEC; no segundo ponto (P-02), foram detectadas duas cepas de ETEC; no P-04, detectaram-se três cepas de ETEC e, no ponto P-05, foram identificadas quatro cepas de ETEC e uma cepa de EHEC.

Foram submetidas ao teste de susceptibilidade nove cepas de ETEC, uma de EHEC e uma de EAEC. Dentre os agentes sanitizantes testados, o hipoclorito de sódio foi o que apresentou maior eficiência nas cinco diluições testadas e ação bactericida sobre todas as linhagens de *E. coli*. De modo geral, os detergentes de marca I e II apresentaram grandes variações em relação à sua ação bactericida e bacteriostática. Já o álcool doméstico teve ação inibitória sobre o crescimento dos microrganismos, mas sua ação bactericida mostrou-se bem inferior em comparação com os outros agentes sanitizantes.

As cepas de ETEC testadas morreram com a ação do hipoclorito de sódio em todas as diluições; o detergente de marca I teve ação bactericida sobre todas as cepas na diluição de 1/8 e a partir da próxima diluição houve uma redução brusca nesta capacidade, até que na última diluição o agente não teve ação bactericida sobre nenhuma das cepas de ETEC. O detergente marca II apresentou eficiência bactericida até a diluição 1/4, mas sua ação bactericida não sofreu uma queda tão grande em comparação com o detergente marca I. Já o álcool doméstico apresentou baixa ação bactericida desde as concentrações mais elevadas do agente (Figura 4).

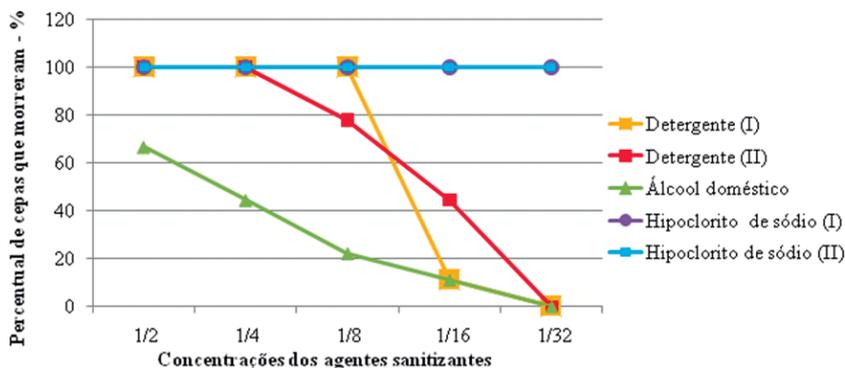


Figura 4. Porcentagem de cepas de ETEC que morreram sob a ação dos agentes sanitizantes.

As cepas de EHEC morreram em decorrência da ação do hipoclorito de sódio em todas as diluições testadas; o detergente de marca I teve ação bactericida sobre todas as cepas na diluição de 1/4 e, a partir da próxima diluição, houve uma redução brusca nesta capacidade, até que na diluição 1/8 o agente não teve ação bactericida sobre as cepas de EHEC. O detergente marca II apresentou eficiência bactericida até a diluição 1/2. Já o álcool doméstico apresentou uma maior eficiência que os detergentes em relação à EHEC. A cepa de EHEC demonstrou ser mais resistente às duas marcas de detergentes testadas (Figura 5).

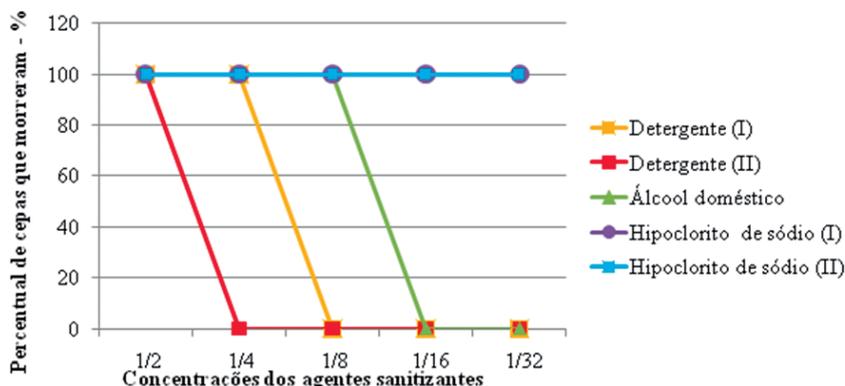


Figura 5. Porcentagem de cepas de EHEC que morreram sob a ação dos agentes sanitizantes.

As cepas de EAEC morreram em consequência da ação do hipoclorito de sódio em todas as diluições testadas; o detergente das marcas I e II e o álcool mostraram ação bactericida até a diluição 1/8 e a partir das outras concentrações não apresentaram mais este efeito (Figura 6).

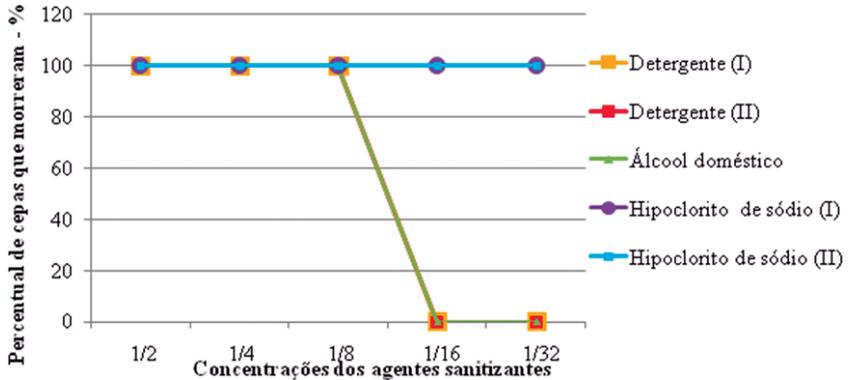


Figura 6. Porcentagem de cepas de EAEC que morreram sob a ação dos agentes sanitizantes.

DISCUSSÃO

A praia é um tipo de ecossistema marinho que, dependendo da hidrodinâmica local, pode abrigar uma elevada concentração de biomassa com presença de inúmeros organismos bivalves, crustáceos e outros invertebrados, além de peixes e até mesmo aves migratórias, compondo dessa forma a cadeia trófica marinha (Correia & Sovierzoski, 2005).

Algumas enterobactérias podem ser encontradas na natureza ou podem fazer parte da microbiota normal do intestino de animais. *E. coli*, um tipo de enterobactéria, é exclusiva do trato intestinal de animais de sangue quente, portanto esta espécie não tem como *habitat* o ambiente marinho e sua presença indica contaminação de origem fecal (Canal, 2010).

Para Ahmed et al. (2008), as águas costeiras são de fácil contaminação por patógenos, seja por meio de fontes difusas (como chuvas) ou pontuais (como córregos de esgoto e de drenagem pluvial). As águas superficiais geradas por fortes chuvas levam consigo tanto efluentes líquidos quanto sólidos com grande potencial para contaminação do ambiente litorâneo.

Vários estudos têm evidenciado que certas bactérias podem persistir em águas recreacionais na ausência de um hospedeiro (Hamilton et al., 2010). Pesquisa realizada por Castro et al. (2002) sobre o comportamento de espécies de *E. coli* ante as condições impostas pelos ecossistemas marinhos (salinidade e radiação solar) concluiu que estas cepas são pouco influenciadas pela salinidade, mas têm baixa resistência quando estão sob forte influência de raios solares, como é o caso das águas costeiras nordestinas. Assim, era de se esperar que, nestes ambientes, fossem encontradas baixas taxas desse microrganismo, mas isso não ocorreu porque as praias recebem constantemente um grande volume de material fecal.

No estudo feito por Barros et al. (2010), do qual se extraíram amostras para este estudo, o ponto que apresentou maior índice de coliformes termotolerantes, ultrapassando o valor máximo permitido pela legislação vigente, foi o P-05, pois 47,82% das amostras analisadas estavam acima dos valores permitidos. Já os pontos P-02 e P-04 apresentaram um índice de 30,43% de valores acima, seguidos pelos pontos P-03 com 26,09%, P-01 com 21,74% e P-06 com 13,04%. Esses dados mostram uma estreita relação entre a quantidade de coliformes termotolerantes e a presença de cepas diarreio gênicas de *E. coli*, pois em pontos com maiores índices de coliformes termotolerantes (P-05, P-04 e P-02) foi identificado um maior número de cepas com genes de virulência.

Os pontos P-05, P-04 e P-01 estão localizados muito próximos de rios com grande carga de poluição; além disso, possuem outros elementos contribuintes de contaminação como pontos de esgoto e de drenagem pluvial, o que pode explicar a presença de cepas de *E. coli* diarreio gênicas nestes locais. No P-02, foram encontradas cepas de ETEC, pois, embora não esteja localizado próximo de rios, possui pontos de esgoto e de drenagem pluvial que podem ter sido determinantes nos resultados. Nos outros pontos, não foram identificadas cepas diarreio gênicas, possivelmente pelo fato de não haver rios nas proximidades dos pontos P-03 e P-06 e a carga de contaminantes, em menor volume, ser facilmente dispersa.

A detecção de *E. coli* diarreio gênica reflete as condições sanitárias inadequadas destes ambientes e comprova o risco à saúde pública, pois o fato de abrigarem genes de virulência constitui forte evidência de serem patogênicas para os homens (Kasnowski, 2004).

As cepas *E. coli* do tipo EHEC podem ser encontradas no intestino de vários animais, inclusive de bovinos que são considerados a maior reserva destes organismos e a mais importante fonte das infecções humanas causadas por estes patógenos. Além dos alimentos de origem bovina, considera-se que outra causa das doenças provocadas por estas linhagens é a ingestão de água, frutas e vegetais contaminados com a dispersão de estrume não tratado no ambiente (Caprioli et al., 2005).

As cepas de EHEC, que anteriormente eram vistas como um tipo de *E. coli* que poderia ser adquirida pela ingestão de carne bovina contaminada, hoje é encontrada em vários ambientes, dentre eles o marinho, como foi demonstrado neste estudo. Outro caso de cepas de EHEC encontradas em recursos hídricos foi evidenciado em estudo feito por Melo (2006) em amostras de água das lagoas de Minas Gerais, locais onde foram identificadas *E. coli* dos tipos EHEC, ETEC e EPEC.

A infecção com cepas *E. coli* do tipo EHEC pode apresentar como resultado desde um portador assintomático até casos de indivíduos com diarreia não sanguinolenta, diarreia inflamatória com disenteria, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica e morte (Koneman et al., 2008; Souza et al., 2010).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produz uma ou duas enterotoxinas – a enterotoxina termo-lábil (LT) e a enterotoxina termoestável (ST) – que constituem um dos seus principais mecanismos de virulência (Nataro & Kaper, 1998). A toxina

LT, encontrada nas cepas de ETEC deste estudo, é muito similar fisiologicamente à toxina da cólera e tem um modo de ação semelhante (Qadri et al., 2005). Estas cepas podem ser causadoras de infecções como diarreia em virtude da ação destas enterotoxinas, o que pode levar à desidratação e até a morte (Stella, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que a ETEC é causa frequente de diarreia em crianças menores de 2 anos de idade. Uma investigação em crianças de 0 a 5 anos em Bangladesh concluiu que 90% dos casos de diarreia por ETEC ocorriam em crianças com idade entre 3 meses e 2 anos. Além disso, verificou-se que, em crianças de 0 a 2 anos de idade, 18% de todas as diarreias eram ocasionadas por ETEC (Qadri et al., 2005).

Infecções causadas por EAEC ocorrem em casos esporádicos ou em surtos, principalmente nos países em desenvolvimento, mas elas também têm sido observadas em países desenvolvidos. Os sinais clínicos de infecções por EAEC são geralmente diarreia com muco aquoso (às vezes sanguinolenta), com febre baixa e pouco ou nenhum vômito, podendo a diarreia persistir por mais de 14 dias (Kuhmert et al., 2000).

Estudo realizado por Guimarães et al. (2000) em hospital do Rio de Janeiro testou alguns agentes sanitizantes para saber sua ação bactericida sobre algumas espécies de bactérias. Entre os agentes testados, o hipoclorito de sódio obteve melhor resultado, pois em todas as diluições testadas teve ação bactericida sobre todas as espécies, inclusive *E. coli*. O mesmo resultado foi obtido neste estudo, pois as duas marcas de hipoclorito de sódio testadas tiveram ação bactericida em todas as diluições, assim considerando que a última diluição continha 0,0001 ml do agente em 3 mL de meio de cultura. Fazendo uma associação, 0,033 mL de hipoclorito pode ser diluído em 1 litro de água, portanto se uma colher de chá contém 2 mL, então até menos que 1/4 de uma colher de chá diluído em 1 L de água é suficiente para desinfecção com exposição de 10 minutos (Massara et al., 2003).

O detergente marca I possui ação bactericida sobre todas as cepas diarreio gênicas até a diluição de 1/4, com 0,375 mL do agente na mistura. Assim, considerando a quantidade de agente na diluição 1/4 e a quantidade de meio em que está diluído, 3 mL, tem-se que para uma mistura de água com este detergente são necessários 1 L de água e 125 mL de detergente. Já o detergente marca II teve eficiência bactericida até a diluição 1/2, isso significa que se tem 1,5 mL de agente para 3 mL de meio de cultura, o detergente pode ser diluído em 50%, ou seja, para 1 litro de água 0,5 litro de detergente.

O álcool doméstico não teve ação bactericida total em nenhuma das diluições, ou seja, não teve ação desinfetante sobre as cepas de *E. coli* diarreio gênicas testadas.

Essa resistência das bactérias testadas aos agentes sanitizantes pode ser explicada pelo fato de o esgoto doméstico possuir grande carga destas substâncias em sua composição, principalmente em relação ao detergente, que é um dos sanitizantes com maior quantidade nos esgotos. Isso faz com que essas bactérias

representem riscos à população por conseguirem persistir num ambiente marinho com características próprias e com a presença de algumas substâncias que são carregadas pelo esgoto.

CONCLUSÕES

É importante que a sociedade tenha um ambiente saneado, pois a presença de contaminante no meio hídrico geralmente não é percebida pela população. Isso ocorre principalmente quando se trata de contaminação por esgotos em praias, pois a dispersão dos efluentes é alta e fica imperceptível aos olhos, mascarando a presença de microrganismos que representam riscos à saúde pública, como a *E.coli* do tipo EHEC encontrada neste trabalho.

As cepas diarreio gênicas detectadas neste estudo têm forte relação com os problemas de esgotamento sanitário em São Luís, pois os pontos onde elas foram identificadas são os que estavam próximos de vários pontos de contaminação (esgoto, drenagem pluvial, rios poluídos). Ficou evidenciado ainda que os locais com maior contaminação corresponderam aos pontos próximos à foz de rios (P-05 e P-04), pois estes carregam contaminantes provindos de várias localidades.

Dentre os agentes sanitizantes testados, o hipoclorito de sódio mostrou ação bactericida total sobre as estirpes testadas; já o álcool doméstico mostrou ação bactericida muito baixa e ambos os detergentes apresentaram muitas variações em relação à sua ação bactericida sobre todas as linhagens diarreio gênicas de *E. coli* testadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA (AEXT-00567/10).

REFERÊNCIAS

1. Ahmed W, Goonetilleke A, Gardner T. Alternative indicators for detection and quantification of faecal pollution. *AWA J Water* 39: 46-49, 2008.
2. Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter* 26: 274-281, 2004.
3. Barros ALR, Almeida NC, Ferro TAF, Figueiredo PMS, Moraes FHR. Detecção e identificação de enteropatógenos em praias no município de São Luís, Maranhão. In: Congresso Sobre Diversidade Microbiana da Amazônia (CDMICRO) e XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), 3., 2009, São Luís. Resumos... Manaus: SBM, 2010. CD-ROM.
4. Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin) – producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* 42: 311-319, 2004.
5. Boehm AB, Fuhrman JA, Mrse RD, Grant SB. A tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: case study at Avalon Bay, Catalina Island, California, USA. *Env Sci Technol* 37: 673-680, 2003.

6. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) – Resolução nº. 274 de 2000.
7. Canal N. Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos. Porto Alegre [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, PUCRS], 2010.
8. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36: 289-311, 2005.
9. Castro HMP, Vieira RHSF, Morelli AMF, Silva AIM. Efeito da radiação solar e da salinidade sobre o crescimento de *Escherichia coli*. In: 8º Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2002. p. 17.
10. Correia MD, Sovierzoski HH. *Ecossistemas marinhos : recifes, praias e manguezais*. EDUFAL. Maceió, 2005.
11. Dalfior JS. Avaliação da eficiência do grupo coliforme fecal como indicador de balneabilidade de praias quando comparado com *Enterococos*: estudo de caso da praia da Curva da Jurema (Vitória, ES). Vitória [Monografia de Graduação em Oceanografia – UFES], 2005.
12. Gouveia N. Saúde e meio ambiente nas cidades: os desafios da saúde ambiental. *Rev Saúde e Sociedade* 8: 49-61, 1999.
13. Guimarães MA, Tibana A, Nunes MP, Santos KRN. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. *Braz J Microbiol* 31: 193-199, 2000.
14. Hamilton MJ, Hadi AZ, Griffith JF, Ishii S, Sadowsky MJ. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon bay, CA. *Water Res* 44: 5463-5473, 2010.
15. IBGE Cidades. Dados do município de São Luis - Censo 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>. Acesso em: 28/02/2011.
16. Kasnowski MC. *Listeria spp., Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói [Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – UFF], 2004.
17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Diagnóstico microbiológico*. MEDSI. Rio de Janeiro, 2008.
18. Kuhmert P, Boerlin P, Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *Microbiol Rev* 24: 107-117, 2000.
19. Lench N, Stanier P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *The Lancet* 1: 1356-1358, 1988.
20. Macêdo NR, Menezes CPL, Lage AP, Ristow LE, Reis A, Guedes RMC. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59: 1117-1123, 2007.
21. Massara CL, Ferreira RS, Andrade LD, Guerra HL, Carvalho OS. Atividade de detergentes e desinfetantes sobre a evolução dos ovos de *Ascaris lumbricoides*. *Cad Saúde Pública* 19: 335-340, 2003.
22. Melo SK. Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual de Rio Doce, Minas Gerais. Ouro Preto [Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – UFOP], 2006.
23. Miranda EE, Coutinho AC, Guimarães. Monitoramento por satélite. Embrapa: Campinas, 2000.
24. Motta RS, Mendes AP, Mendes FE, Young CEF. Perdas e serviços ambientais do recurso água para uso doméstico. *PPE* 24: 35-72, 1994.
25. Nascimento MS, Berchieri JRA, Barbosa MD, Zancan FT, Almeida WAF. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. *Rev Bras Ciênc Avic* 2: 85-91, 2000.
26. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201, 1998.
27. Oliveira RC. Ambiente costeiro fragilidades e impactos relacionados a ação antrópica: o cenário da baixada santista no estado de São Paulo/Brasil. In: 12º Encuentro de geógrafos de América Latina - caminando en una América Latina en transformación. Montevideo, 2009.
28. O'ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Pediatric Infectious Diseases* 16: 125-136, 2005.

29. Pupulin ART, Carvalho PG, Nishi L, Nakamura CV, Guilherme ALF. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 551-555, 2009.
30. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 18: 465-483, 2005.
31. Sales TEA. Estudo da balneabilidade das praias urbanas do município de Natal-RN durante o ano de 2005. Natal [Dissertação de Mestrado em Engenharia Sanitária – UFRN], 2006.
32. Santos MV. Diagnóstico socioambiental e avaliação das condições sanitárias da água de praias de São Luis - MA (Brasil), no decênio 1989-2009. In: Congresso de Meio Ambiente da AUGM, 6., 2009, São Luís. Anais... São Carlos: UFSCAR, 2009.
33. Silva VC, Nascimento AR, Mourão APC, Coimbra Neto SV, Costa FN. Contaminação *Enterococcus* da água das praias do município de São Luís, Estado do Maranhão São Luís, Estado do Maranhão. *Acta Sci Technol* 30: 187-192, 2008.
34. Sepp R, Szabo I, Uda H, Sakamoto H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J Clin Pathol Kagawa* 47: 318-323, 1994.
35. Souza MRSM, Klassen G, Toni F, Rigo LU, Henkes C, Pigatto CP, Dalagassa CB, Fadel-Picheth CMT. Biochemical properties, enterohaemolysin production and plasmid carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 318-321, 2010.
36. Stella AE. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Jaboticabal [Tese de Doutorado em Microbiologia Agropecuária – UNESP], 2009.
37. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 41: 2669-2671, 2003.
38. UNICEF, WHO. *Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done*. WHO Library. Geneva, 2009.
39. Xavier MO, Madrid IM, Meinerz ARM, Cleff MB, Schuch LFD, Nobre MO, Meireles MCA. Atividade in vitro de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. *Arq Inst Biol* 74: 49-53, 2007.