

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Vibrio parahaemolyticus* E *Vibrio  
cholerae* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

**IRANA PAIM SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO - 2014**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Vibrio parahaemolyticus* E *Vibrio  
cholerae* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

**IRANA PAIM SILVA**

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dra. Norma Suely Evangelista Barreto

Co-Orientador: Dra. Oscarina Viana de Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**FEVEREIRO - 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Irana Paim

Perfil de resistência antimicrobiana e fatores de virulência em isolados de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em amostras ambientais / Irana Paim Silva. – Cruz das Almas: [s. n.], 2014. 116f.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

Orientador: Dra. Norma Suely Evangelista Barreto

Co-Orientador: Dra. Oscarina Viana de Souza

1. *Vibrio parahaemolyticus*. 2. *Vibrio cholerae*.  
3. Resistência antimicrobiana. I. Título.

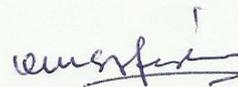
CDD 589.95

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

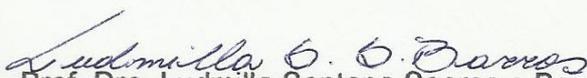
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**IRANA PAIM SILVA**



Prof. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientador)



Prof. Dra. Elisa Teshima  
Universidade Estadual de Feira de Santana



Prof. Dra. Ludmilla Santana Soares e Barros  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_”.

*Aos meus pais Antonio Fernando e  
Iracene que sonharam comigo este sonho e  
lutaram para que eu pudesse conquistar.*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa caminhada muitas foram às escolhas, tantas as dificuldades, mas também foram várias as conquistas. É com grande satisfação que agradeço e dedico essa vitória a todos que contribuíram para a realização desse sonho.

A **Deus** que me deu força e coragem para seguir em frente e não desistir nunca. Aos meus pais **Antonio Fernando** e **Iracene** pelo carinho, esforço e credibilidade.

Aos meus **irmãos** e **cunhado(as)** pela paciência, dedicação, companheirismo e amizade. Vocês foram acima de tudo um exemplo, cada um com sua peculiaridade. Aos meus **sobrinhos** pela energia!

Aos amigos que respeitadamente conquistei no Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR da Universidade Federal do Ceará, a **Prof. Dra. Oscarina Viana Sousa**, **Dra. Francisca Gleire Menezes**, **Dra. Cristiane Teles** e **Daniel Rodrigues** que irei levar comigo para sempre.

A minha Orientadora **Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto**, um exemplo de força, determinação e profissionalismo, que acreditou que eu era capaz e muitas vezes deu-me um norte, incentivando a sempre buscar algo maior. A sua presença foi fundamental para a construção da profissional que sou hoje.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho, **Carla**, **Marly**, **Camila**, **Ana** pelo companheirismo e força sempre, vocês foram de vital importância para conclusão deste trabalho. Aos novos estagiários que conquistaram o meu coração **Sanmily**, **Lucas**, **Virginia** e **Paulo**.

Enfim, a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho, que chamaram a atenção quando preciso, apoiaram quando fora necessário e acreditaram sempre.

***Muito obrigada!***

## LISTA TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
<b>Tabela 1.</b> Iniciadores utilizados na caracterização molecular dos isolados de <i>V. parahaemolyticus</i> .	55
<b>Tabela 2.</b> Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de <i>V. parahaemolyticus</i> .	55
<b>Tabela 3.</b> Espécies de <i>Vibrio</i> isoladas em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.	58
<b>Tabela 4.</b> Percentual de resistência das estirpes de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolados em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.	61
<b>Tabela 5.</b> Multiresistência microbiana e resistência plasmidial das cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isoladas em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.	63
<b>Tabela 6.</b> Percentual da presença de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) em <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolados em água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.	65
<b>Tabela 7.</b> Perfil de virulência fenotípico em cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de água, moluscos bivalves <i>in natura</i> e	67

processado no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

### **CAPÍTULO 3**

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados na análise molecular para a detecção da patogenicidade em *Vibrio cholerae*. 84

**Tabela 2.** Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de *Vibrio cholerae*. 85

**Tabela 3.** Percentual de resistência das estirpes de *Vibrio cholerae* em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil. 89

## LISTA FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
<b>Figura 1:</b> Surtos de DVAs no Brasil por tipo de alimento contaminado de 1999 a 2008. Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS (SANTOS 2010).	26
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolados de água (A), moluscos bivalves in natura (Mb) e sururu processado (Sp) no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.	64
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Figura 1.</b> Perfil eletroforético da reação em cadeia da polimerase (PCR) das cepas de <i>Vibrio cholerae</i> com os primers <i>OmpW</i> (304 pb). M (Marcador) e B (Branco)	88
<b>Figura 2.</b> Perfil eletroforético do PCR de <i>Vibrio cholerae</i> para virulência: <i>ctxAB</i> (536 pb), <i>tcp</i> (805 pb), <i>rfbO1</i> (638 pb) e <i>zot</i> (947 pb). M (Marcador); B (Branco) e Padrões de <i>Vibrio cholerae</i> (P1, P2 e P3).	94

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>CAPÍTULO 1</b>	19
<b>A importância dos vibrios em surtos alimentares: uma revisão</b>	
<b>Resumo</b>	20
<b>1. Ação antrópica</b>	22
<b>2. Moluscos Bivalves</b>	22
2.1. <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1828)	23
2.2. <i>Mytella guyanensis</i> (Lamarck, 1819)	24
<b>3. Doenças veiculadas por alimentos (DVAs)</b>	24
<b>4. O gênero <i>Vibrio</i></b>	26
4.1. Patogenicidade e fatores de virulência	27
4.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
4.3. <i>Vibrio cholerae</i>	29
<b>5. Resistência antimicrobiana</b>	30
5.1 Grupo dos $\beta$ -lactâmicos	32
<b>6. Referências</b>	34
<b>CAPÍTULO 2</b>	47
<b>Caracterização da resistência antimicrobiana e perfil de virulência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de água e moluscos bivalves</b>	

<b>Resumo</b>	48
<b>1. Introdução</b>	51
<b>2. Materiais e Métodos</b>	53
2.1. Local e coleta das amostras	53
2.2. Análises microbiológicas	53
2.3. Extração de DNA total	54
2.3.1. Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (RCP)	54
2.4. Suscetibilidade antimicrobiana	56
2.5. Resistência mediada por plasmídios-R	56
2.6. Produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS)	57
2.7. Teste de virulência fenotípicos	57
<b>3. Resultados e Discussão</b>	58
3.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	60
3.2. Presença de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS)	65
3.3. Fatores de virulência fenotípicos	66
<b>4. Conclusão</b>	69
<b>5. Agradecimentos</b>	70
<b>6. Referências</b>	70

## **CAPÍTULO 3** 79

### **Perfil da Resistência antimicrobiana e patogenicidade de *Vibrio cholerae* em amostras ambientais**

<b>Resumo</b>	80
<b>1. Introdução</b>	82
<b>2. Materiais e Métodos</b>	83
2.1. Isolamento e identificação	83
2.2. Análise sorológica	84
2.3. Perfil de virulência	84
2.4. Extração de DNA total	84
2.5. Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	85

2.6. Suscetibilidade antimicrobiana	86
2.7. Resistência mediada por plasmídios-R	87
2.8. Produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls)	87
<b>3. Resultados e Discussão</b>	87
3.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	89
3.2. Detecção de produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls)	91
3.3. Perfil de Virulência	92
3.3.1. Análise sorológica	92
3.3.2. Análise genética da virulência	93
<b>4. Conclusão</b>	94
<b>5. Agradecimentos</b>	95
<b>6. Referências</b>	95
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	102
<b>ANEXO</b>	103

## RESUMO

### **Silva. I. P. Perfil de resistência antimicrobiana e fatores de virulência em isolados de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em amostras ambientais**

Dentre as espécies capazes de causar infecções em humanos, se destacam o *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. A capacidade desses microorganismos em causarem gastroenterite humana, associada ao consumo de moluscos *in natura* ou insuficientemente cozidos, tem aumentando a sua importância para a Vigilância Sanitária de Alimentos. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil de suscetibilidade antimicrobiano e fatores de virulência em isolados de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* provenientes de amostras ambientais. Mensalmente durante 15 meses foram realizadas coletas de água, ostras e sururus (*in natura* e processado) no estuário de São Francisco do Conde, Bahia, totalizando 45 amostras de água, 30 de moluscos bivalves *in natura* e 15 de moluscos processado. A identificação bioquímica das estirpes foi realizada com chave de identificação para cepas ambientais. Para a suscetibilidade antimicrobiana foram utilizados 11 fármacos de sete famílias, concentração inibitória mínima (CIM) e produção de enzimas metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ Ls). A caracterização fenotípica de virulência de *V. parahaemolyticus* foi realizada mediante testes enzimáticos (amilase, caseinase, DNase, fosfolipase, gelatinase, lipase e urease) e atividade hemolítica, além dos genes *tdh* e *trh*. Para o *V. cholerae* foi realizada caracterização sorológica e molecular com os iniciadores *ompW*, *ctxAB*, *tcp*, *rfbO1* e *zot*. Do total de isolados, os testes bioquímicos confirmaram 67% (30/45) para *V. parahaemolyticus* (38% de água, 18% de moluscos bivalves *in natura* e 11% para o sururu processado) e 13% (06/45) para o *V. cholerae* (07% de água e 07% de bivalves *in natura*). Pela caracterização molecular foram identificados 100% (06/06) das cepas de *V. cholerae*. *Vibrio parahaemolyticus* se mostrou resistente a pelo menos um dos 11 antimicrobianos testados, com maior resistência para a ampicilina (97%) (CIM de 400  $\mu$ g) e cefalotina (93%) (CIM de  $\leq$  100  $\mu$ g). Para o *V. cholerae* apenas 33% dos isolados foram resistentes ao imipenem (CIM de 20 $\mu$ g). Perfil de

multiresistência nos isolados de *V. parahaemolyticus* foi observado em 59% das cepas de água, em 75% dos moluscos bivalves *in natura* e em 20% do sururu processado. Multiresistência não foi detectada nos isolados de *V. cholerae*. Todos os isolados de *V. cholerae* e *V. parahemolyticus* foram produtores de enzimas MβLs. O perfil fenotípico de virulência para o *V. parahaemolyticus* foi maior para a amilase (97%), seguido da DNase (83%), fosfolipase (70%), atividade β-hemolítica (57%), gelatinase (43%), lipase (13%) e caseinase (7%), não sendo observado atividade para a urease. De acordo com a análise sorológica *V. cholerae* sorogrupo O1 foi confirmado em 50% das cepas, sendo 67% de água e 33% de moluscos bivalves *in natura*. Em ambos os micro-organismos não foram encontrados genes associados à virulência *ctxAB*, *tcp*, *rfbO1* e *zot* (*V. cholerae*), *tdh* e *trh* (*V. parahaemolyticus*). O estuário de São Francisco do Conde vem sofrendo com o lançamento de antimicrobianos na água, fazendo com que parte dos micro-organismos apresentem resistência antimicrobiana. Apesar de não ter sido observada a expressão de genes associados à virulência, a presença de fatores fenotípicos que permitem invadir e colonizar o organismo serve de alerta quanto ao risco de surtos alimentares, envolvendo a população consumidora de pescado na região, visto que são bactérias indígenas de ambientes estuarinos que transitam entre a água e os organismos residentes.

**Palavras chaves:** moluscos bivalves, patogenicidade, gastroenterite, saúde pública.

## ABSTRACT

### **Silva. I. P. Profile of antimicrobial resistance and virulence factors in isolates of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in environmental samples**

Among the species capable of causing human infections, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* are highlighted. The capability of these microorganisms of causing human gastroenteritis, associated with consumption of raw or barely cooked shellfish, has increased its importance for Food Sanitary Vigilance. Based on this, this study aims to establish the profile of antimicrobial susceptibility and virulence factors in isolates of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* from environmental samples. A monthly collect of water, oysters and mussels (fresh and processed), was performed along 15 months, in the estuary of São Francisco do Conde, Bahia, counting 45 water samples, 30 samples of bivalve molluscs *in natura* and 15 processed molluscs. The strains biochemical identification was performed with identification key to environmental strains. For the antimicrobial susceptibility, 11 pharmacos of seven families were used along with minimum inhibitory concentration (MIC) and enzyme production metallo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ Ls). Phenotypic characterization of *V. parahaemolyticus* virulence was performed by exozymatic tests (amylase, caseinase, DNase, phospholipase, gelatinase, lipase and urease) and hemolytic activity, in addition to genes *tdh* and *trh*. For the *V. cholerae* serological and molecular characterization were performed with *ompW*, *ctxAB*, *tcp*, *zot* and *rffO1*. Out of the total, biochemical tests confirmed 67 % (30/45) for *V. parahaemolyticus* (38 % of water, 18% of fresh bivalve molluscs and 11% of processed mussels) and 13% (06/45) *V. cholerae* (07% of water and 07% of fresh bivalves). Along with the molecular characterization, 100% (06/06) of the strains of *V. cholerae* were identified. *Vibrio parahaemolyticus* turned out to be resistant to at least one of the 11 antimicrobials used in tests and had a greater resistance to ampicillin (97%) (MIC 400 mg) and cephalothin (93%) (MIC of  $\leq$  100 mg). When focusing on *V. cholerae*, only 33% of the isolates were resistant to imipenem (MIC 20 $\mu$ g). Profile of multidrug resistance in isolates of *V. parahaemolyticus* was found in 59% of water strains, in 75% of fresh bivalve molluscs and 20% of processed the mussels. Multidrug resistance was not detected in isolates of *V. cholerae*. All isolates of *V. parahaemolyticus* and

*V. cholerae* were MβLs enzymes producers. The phenotypic profile of virulence of *V. parahaemolyticus* was higher to amylase (97%) followed by DNase (83%), phospholipase (70%), β - hemolytic activity (57%), gelatinase (43%), lipase (13%) and caseinase (07%), no activity was observed for urease. According to the serological analysis of *V. cholerae* serogroup O1 was confirmed in 50% of the strains, with 67% water and 33% of fresh bivalve molluscs. In both micro-organisms no genes associated with virulence *ctxAB*, *tcp*, and *rfbO1*, *zot* (*V. cholerae*), *tdh* and *trh* (*V. parahaemolyticus*) were found. The estuary of São Francisco do Conde has suffer with antimicrobials water release, causing antimicrobial resistance in part of the present micro-organisms. Although the expression of genes associated with virulence has not been observed, the presence of phenotypic factors that allows the human organism to be invaded and colonized serves as a warning about the risk of foodborne poisoning outbreaks, involving local consumer population of fish, since they are indigenous bacteria from estuarine environments that transits between water and living organisms.

Keywords: bivalve molluscs, pathogenicity, gastroenteritis, public health.

# INTRODUÇÃO

Os vibrios são bactérias pertencentes à família Vibrionaceae, habitantes de ambientes estuarinos e marinhos, Gram-negativas, móveis, mesofílicas e anaeróbias facultativas (AUSTIN et al., 2005; AUSTIN, 2010). Mundialmente, diversas espécies têm sido reconhecidas como patógenos de interesse para o homem, sendo isoladas tanto em regiões costeiras de clima temperado como tropical (PEREIRA et al., 2007).

Atualmente, o gênero compreende mais de 102 espécies (DSMZ, 2013), sendo as espécies de relevância clínica o *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Espécies como *V. alginolyticus*, *V. mimicus* e *V. hollisae* (agora *Grimontia hollisae*), *V. furnissii* e *V. damsela* têm sido esporadicamente associados a infecções em humanos e relacionados com doenças em animais aquáticos (ZANNETI et al., 2001; CARIANI et al., 2012; MANJUSHA; SARITA, 2013).

A principal característica deste grupo é a capacidade em causar intoxicação alimentar grave associada ao consumo de peixes e mariscos contaminados *in natura* ou mal cozidos (ESPIÑEIRA et al., 2010). Entre os surtos de origem alimentar ocorridos em 13 províncias da China em 2003, cerca de 40% dos pacientes encontrava-se infectados com *V. parahaemolyticus* (NAIR et al., 2007). No Brasil, Ceará, esta bactéria foi responsável por um surto de gastroenterite envolvendo 26 indivíduos devido à ingestão de caranguejo cru em um restaurante (SANTOS; VIEIRA, 2013).

A patogênese das infecções causadas pelos vibrios é complexa e relacionada com uma variedade de fatores de virulência, como citotoxinas, enterotoxinas, enzimas líticas e a produção de polissacarídeo capsular, além de hemaglutinina (MASINI et al., 2007; CABRERA-RODRIGUES et al., 2008). A maioria dos agentes patogênicos Gram-negativos perturbam a fisiologia normal da mucosa intestinal, por induzir rearranjos do citoesqueleto, respostas pró-inflamatórias e/ou morte celular (NAIR et al., 2007).

Cepas toxigênicas de *Vibrio cholerae* sorogrupos O1 e O139 são os agentes causadores da cólera, capazes de causarem surtos de grandes proporções

(ISLAM et al., 2004; ISMAIL et al., 2013). A patogênese da cólera é um processo complexo que envolve ações sinérgicas de vários genes, dentre eles *ompW* (proteína da membrana externa), *ctx* (toxina colérica), *tcp* (toxina co-regulador do pilus), *zot* (toxina zonula occludens) e *rfbO1* (antígeno somático) (GOEL et al., 2007).

Peixes e mariscos foram responsáveis por epidemias ou em casos isolados de cólera nos Estados Unidos, Itália, Portugal e Austrália (GONÇALVES et al., 2004). Em 1978, nos Estados Unidos, em Los Angeles um surto de cólera foi associado a caranguejos capturados no Golfo do México e que tinham sido transportados do Equador para Nova York (AUSTIN, 2010). No Brasil, no período de 1991 a 2001 foram descritos 168.598 casos de cólera com 2.036 óbitos. Em Pernambuco, em 2004 foram confirmados 21 casos de cólera e em 2005 cinco casos (RISTORI et al., 2006).

Cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* podem ser detectadas com base em sua capacidade de produzir uma hemolisina termoestável direta (gene *tdh*) e hemolisina termoestável relacionada (gene *trh*) (YOON et al., 2008; RAGHUNATH et al., 2008; COSTA-SOBRINHO et al., 2011). A hemolisina termoestável direta é identificada como uma importante enterotoxina em mamíferos e considerada como o principal fator de virulência para o *V. parahaemolyticus* (HONGPING et al., 2011).

Nos Estados Unidos no período de maio a agosto de 2013, *V. parahaemolyticus* foi responsável por surtos alimentares em 13 estados, com predominância para o sorotipo O4:K12 (CDC, 2013).

O uso indiscriminado e constante de antimicrobianos na medicina humana e veterinária tem determinado o aumento da resistência bacteriana, interferindo no tratamento efetivo das infecções por estes agentes (BACCARO et al., 2002). A resistência aos antimicrobianos representa uma grave ameaça para a saúde pública por envolver cada vez mais espécies bacterianas e novos mecanismos de resistência (DIAZ et al., 2006).

O grupo dos  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana, sendo a resistência a esta classe devido a presença de enzimas capazes de causarem hidrólise do composto (PONTES et al., 2009). Dentre estas enzimas, as metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) apresentam um largo

espectro de atividade, hidrolisando as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (VILLEGAS et al., 2006; PONTES et al., 2009).

O município de São Francisco do Conde faz parte da região metropolitana de Salvador, distante 66 Km da capital baiana, que se destaca por ser uma área de intensa extração de moluscos bivalves e atividades petrolíferas. O município apresenta um índice de desenvolvimento econômico entre os três melhores do estado, embora para os demais índices, educação e saúde, estes se encontrem entre os piores (FONTOURA et al., 2009).

Apesar de o município responder por 40% do abastecimento de água da região metropolitana, e tratar-se de uma área de proteção ambiental (SANTOS, 2011), a degradação do ambiente na região contribui para a poluição das águas, solo e ar (FONTOURA et al., 2009), reduzindo a qualidade dos organismos extraídos e elevando o risco do seu consumo, além de favorecer a proliferação de micro-organismos patogênicos.

# OBJETIVOS

## Geral

Estabelecer o perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos, bem como verificar a presença de fatores de virulência entre os isolados de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* isolados em amostras ambientais no estuário de São Francisco do Conde, Bahia, Brasil.

## Objetivos Específicos

1. Isolamento e identificação das estirpes de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*.
2. Estabelecer o perfil de resistência e multiresistência das estirpes estudadas.
3. Caracterizar a origem da resistência como intrínseca ou adquirida.
4. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antimicrobianos.
5. Detecção de cepas produtoras de enzimas metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ LS).
6. Avaliar a presença de fatores fenotípicos e genéticos de virulência.

---

## **CAPÍTULO 1**

**A importância dos vibrios em surtos alimentares: uma revisão**

---

## RESUMO

### **Silva. I. P. A importância dos vibrios em surtos alimentares: uma revisão**

Os vibrios pertencem à família Vibrionaceae, são bactérias indígenas de ambiente estuário capazes de causar surtos alimentares e/ou infecções cutâneas em humanos. *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* estão entre as espécies patogênicas de maior relevância para a saúde pública, principalmente quando associados às doenças veiculadas em alimentos (DVAs). Muitos dos surtos estão associados à capacidade em produzirem toxinas, tais como a hemolisina direta termoestável (*tdh*), hemolisina termoestável relacionada (*trh*) e a toxina colérica, além de produção de exoenzimas, sinalizadores de virulência. Outro fator de importância para a saúde pública tem sido o aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos, influenciada pelo uso contínuo desses fármacos e o seu descarte em reservatórios de água. A presença de micro-organismos potencialmente patogênicos e resistentes às principais classes de antimicrobianos em amostras de água e alimentos representa um risco, principalmente para as populações ribeirinhas, habitantes de regiões estuarinas e dependentes do ambiente na obtenção do alimento e lazer.

**Palavras chave:** moluscos bivalves, virulência, gastroenterites, resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

**Silva. I. P.** The vibrios importance in foodborne disease outbreak: a review

The vibrios belong to the *Vibrionaceae* family and are indigenous bacteria of estuarine environment, capable of causing either foodborne disease outbreaks or skin infections in humans. *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* are among the most relevant pathogenic species for public health, especially when associated with FBDs (Foodborne Diseases) linked to the consumption of raw fish or insufficiently cooked fish. Many outbreaks are associated with the ability of microorganisms to produce toxins, such as the thermostable direct hemolysin (*tdh*), thermostable related hemolysin (*trh*), cholera toxin, besides virulence enzymatic factors. Another important fact to public health is the increase of microbial resistance to antimicrobial agents, influenced by the continuous use of these drugs and their disposal into water reservoirs. It is a risk the attendance in food and water samples of potentially pathogenic microorganisms that are resistant to major class of antimicrobials, especially for riverine populations that inhabit estuarine areas and depend on the environment for their food and leisure.

Keywords: bivalve molluscs, virulence, gastroenteritis, antimicrobial resistance.

## **1. AÇÃO ANTRÓPICA**

O estuário é a interface entre o deságue fluvial do continente e o oceano adjacente, sendo parte integrante da zona costeira, composto por uma descarga de água doce do continente e a ação de ondas e marés do oceano (LOITZENBAUER; MENDES, 2011). O funcionamento dos estuários compõe interações complexas entre processos físicos, biogeoquímicos e biológicos, estando entre as áreas mais produtivas da terra (PASQUAUDA et al., 2012). Os estuários também são importantes do ponto de vista ecológico, uma vez que funcionam como locais de desova para espécies de animais (ZENG et al., 2011).

De acordo com o censo de 2010, 24% da população brasileira vive na zona costeira, o que compreende aproximadamente 45 milhões de pessoas, além do desenvolvimento de grandes centros industriais, atividades portuárias e fazendas de camarão (LOITZENBAUER; MENDES, 2011).

Os efeitos do desenvolvimento global e o crescimento da população humana têm alterado os estuários por meio da destruição de habitats, a presença de poluentes tóxicos (pesticidas e metais-traço), a elevação da carga orgânica (efluentes orgânicos e cultivo de animais), alterações do fluxo de água, bem como a crescente ocupação humana nas regiões litorâneas sem um planejamento ambiental adequado (O'HIGGINS et al., 2010; BRANCO et al., 2011). Todos estes fatores têm resultado em uma redução da qualidade do estuário e da capacidade em prover os produtos da pesca, bem como atividades de lazer para a população (O'HIGGINS et al., 2010).

## **2. MOLUSCOS BIVALVES**

Os moluscos bivalves são organismos filtradores, com a capacidade de filtrarem aproximadamente 19 a 50 L/h, com alguma ou nenhuma capacidade seletiva, acumulando em sua massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas, toxinas, poluentes químicos (metais pesados) e biológicos (micro-organismos) (RODRIGUES et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2011).

Os moluscos representam o terceiro maior grupo de animais cultivados no mundo, com 13,1 milhões de toneladas produzidas em 2008. Neste grupo, as

ostras representam 31,8%, os bivalves de sedimento 24,6%, os mexilhões 12,4% e as vieiras 10,7% (CARDOSO JUNIOR et al., 2012).

A microbiota presente nos moluscos bivalves é variável e depende da qualidade da água no qual é capturado e/ou cultivado, bem como da qualidade da água utilizada nas etapas de lavagem e processamento, além da estocagem e manipulação (JAY, 2005).

A presença de micro-organismos patogênicos nos moluscos bivalves pode levar ao aparecimento de doenças veiculadas por alimentos (DVAs) que podem ser causadas tanto por um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido, como pela toxina por ele produzida (VIEIRA et al., 2008). A capacidade em veicular doenças está associada principalmente à cultura de algumas regiões em consumi-los crus ou levemente cozidos, sendo frequente casos de intoxicação e infecção alimentar (NASCIMENTO et al., 2011). No Brasil, não existem limites para a presença desses micro-organismos em moluscos bivalves, apenas para produtos à base de pescados não consumidos crus.

Para as comunidades ribeirinhas que vivem próximas aos manguezais, os moluscos bivalves representam um dos grupos de maior relevância econômica. A coleta desses animais se constitui na principal fonte de renda das famílias ou complementa a renda oriunda de atividades assalariadas (ARAUJO et al., 2009).

### **3.1. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)**

As ostras são moluscos bivalves que pertencem ao Filo Mollusca e classe Bivalvia. Consideradas um alimento altamente nutritivo e de valor cultural, suas valvas são utilizadas pela população ribeirinha para a fabricação de objetos artesanais (RODRIGUES, 2009).

As ostras nativas de maior interesse econômico no litoral brasileiro pertencem ao gênero *Crassostrea*, da família *Ostreidae* (FORCELINI et al. 2009). Sua distribuição geográfica abrange desde a região Sul do Caribe, Venezuela, Suriname e Brasil até o Uruguai (EVANGELISTA-BARRETO; SOUSA; VIEIRA, 2008).

Conhecida como ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* é uma espécie gonocórica (quando os sexos ocorrem separadamente nos indivíduos), de tamanho médio, que alcança 100 mm de altura, apresentando concha grossa e de

forma variável. Típica de zonas tropicais ocorre principalmente fixada às raízes da *Rhizophora mangle* ou sobre zonas entremarés e costões rochosos (DUÉ et al., 2010).

O consumo da ostra *in natura*, principalmente nas regiões litorâneas brasileiras como o nordeste, tem incentivado o cultivo desse molusco, em virtude de ser uma das principais espécies de bivalves consumidos *in natura* (NASCIMENTO et al., 2009). No entanto, quando contaminadas com patógenos humanos, as ostras não apresentam sinal externo de contaminação, como alteração de cor, sabor ou odor ruim, o que permite ser um veículo de DVAs quando ingeridas cruas ou parcialmente cozidas (RODRIGUES, 2009).

### **3.2. *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819)**

No Brasil, as espécies de mitílídeos de interesse comercial são *Mytella falcata* e *Mytella guyanensis* de água salobra, e *Perna perna* e *Mytilus edulis platensis* de água oceânica (PEREIRA et al., 2003). Sua distribuição vai desde o México ao Peru, no Oceano Pacífico, e da Venezuela ao Brasil, no Atlântico (RIOS, 2009).

A espécie *M. guyanensis* é encontrada em todo o litoral brasileiro. Possui como habitat natural as águas salobras, vivendo enterrados em substratos lodosos de zona entremarés em ambientes estuarinos (SANTOS; VIEIRA, 2003). Os bancos naturais de *M. guyanensis* se encontram distribuídos embaixo dos bosques de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* (PEREIRA et al., 2003).

Este molusco tem um elevado valor protéico, econômico e cultural, sendo largamente consumido no nordeste brasileiro e muitas vezes a única fonte de renda de comunidades carentes (SANTOS; VIEIRA, 2013).

## **4. DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS (DVAs)**

As síndromes resultantes da ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) ou simplesmente Toxinfecções (OLIVEIRA et al., 2010). As DVAs são síndromes clínicas que podem ser

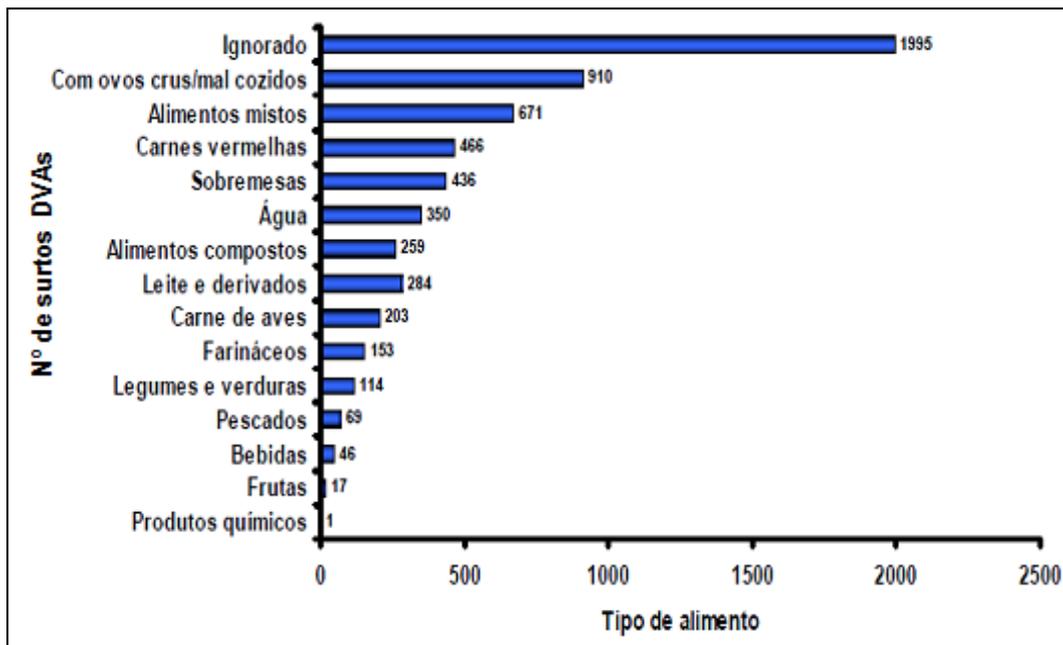
ocasionadas por parasitos (protozoários e helmintos patogênicos), produtos químicos (pesticidas e metais-traço) e micro-organismos ou produtos resultantes de seu metabolismo (toxinas e aminas biogênicas) (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Os alimentos geralmente são contaminados pela manipulação incorreta, falhas higiênicossanitárias na produção, armazenagem, processamento e conservação (IWAMOTO et al., 2010). No entanto, a maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração sensorial visível. Isso ocorre porque a dose infectante do patógeno geralmente é inferior à quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

Anualmente, a incidência de doenças relacionadas ao consumo de alimentos tem crescido exponencialmente. A maioria dos casos de DVAs não é notificado, pois muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (MARCHI et al., 2011). Em diversos países, inclusive no Brasil, os surtos notificados se restringem àqueles que envolvem um maior número de pessoas ou quando a duração dos sintomas é prolongado (OLIVEIRA et al., 2010).

Os moluscos têm sido frequentemente envolvidos em diversos surtos alimentares (BAFFONE et al., 2001; AUSTIN, 2010). O Centro Norte-Americano para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relatou que os peixes e mariscos estão envolvidos em 5% dos casos individuais e em 10% de todos os surtos de DVAs, sendo a maioria dos surtos decorrentes do consumo de moluscos bivalves (OLGUNOGLU, 2012).

Dados do Departamento Nacional de Vigilância em Saúde (SVS, Brasil) mostram a ocorrência de 6.602 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre o período de 1999 a 2008, dos quais apenas 69 foram associados ao consumo de frutos do mar (SANTOS; VIEIRA, 2013) (Figura 1).



**Figura 1:** Surtos de DVAs no Brasil por tipo de alimento contaminado de 1999 a 2008. Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS (SANTOS, 2010).

Um estudo realizado no estado do Paraná mostrou que no ano de 2000 foram gastos pelo governo cerca de dois milhões de reais, somente em internações devido às DVAs (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

Em São Paulo, de acordo com os dados gerados pelo banco de dados da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA) e do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), em 2008 foram relatados 374 surtos de DVAs (com 23.590 casos). Destes, 183 surtos (3.290 casos) ocorreram no município de São Paulo, representando 49% do total de surtos notificados. Em 169 (92%) dos casos o sintoma foi a diarreia (BECVE, 2012).

#### 4. O GÊNERO *Vibrio*

Os vibrios pertencem à família Vibrionaceae e o número de espécies que compõem o gênero compreendem 102 espécies (DSMZ, 2013). São bactérias Gram-negativas, geralmente móveis, mesofílicas e anaeróbias facultativas (AUSTIN et al., 2005).

Os vibrios são habitantes naturais de ambientes marinhos, onde, sob condições de salinidade e temperatura favoráveis são ingeridos em quantidades

elevadas por organismos aquáticos, peixes e mariscos, especialmente, animais filtradores, como mexilhões e ostras (ESPIÑEIRA et al., 2010).

Os vibrios apresentam importância epidemiológica, visto que pelo menos 13 espécies causam infecções em humanos. Destas, as mais relevantes são as espécies de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (FAO/WHO, 2001; SOUSA et al., 2004). As espécies de *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* também têm recebido atenção por causarem doenças em animais aquáticos (MANJUSHA, SARITA, 2013).

A principal característica deste grupo de bactérias é a capacidade de causar intoxicação alimentar grave associada ao consumo de peixes e mariscos contaminados crus ou mal cozidos (ESPIÑEIRA et al., 2010).

Entre o período de 1988 a 1997, uma revisão sobre infecções ocasionadas por *V. parahaemolyticus* mostrou que 88% dos pacientes com gastroenterite e 91% com septicemia relataram ter ingerido ostras cruas (KANUNGO et al., 2012). Em 2003, entre os surtos de origem alimentar ocorridos em 13 províncias da China, cerca de 40% dos pacientes se encontravam infectados com *V. parahaemolyticus* (NAIR et al., 2007).

No Brasil, alguns trabalhos relatam o isolamento de *V. vulnificus* em mariscos, principalmente ostras, comercializadas em São Paulo, Bahia e Ceará associado a casos de diarreia e septicemia (ARAUJO et al., 2007).

#### **4.1. Patogenicidade e fatores de virulência**

A definição do termo patogenicidade consiste na capacidade de um micro-organismo em causar a doença, enquanto a virulência é a capacidade quantitativa do agente provoca-la, envolvendo o processo de invasão e a toxigenicidade (VIEIRA, 2009; BROOKS et al., 2010).

Os micro-organismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que desestabilizam a fisiologia do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

A patogênese das infecções causadas por vibrios é complexa e relacionada a uma variedade de fatores de virulência, como as citotoxinas, enterotoxinas,

enzimas líticas, produção de polissacarídeo capsular (MASINI et al., 2007; CABRERA-RODRIGUES et al., 2008), produtos extracelulares, tais como proteases, fosfolipases e hemolisinas, sendo a sua produção variada entre os isolados (ROCHA, 2011).

#### **4.2. *Vibrio parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria indígena de ambientes estuários e marinhos, frequentemente isolado em zooplâncton, peixes costeiros e mariscos (HONGPING et al., 2011; HOSSAIN; KIM; KONG, 2013), que requer concentrações de NaCl em torno de 1 a 3% para sobreviver e se multiplicar (ALIPOUR; ISSAZADEH; SOLEIMANI, 2014). Seu tempo de duplicação varia de oito a nove minutos, em moluscos é de 12 a 18 minutos a 37°C, o que facilita atingir a dose infecciosa de  $10^5$  e  $10^7$  UFC/g (RODRIGUES AUGUSTO, 2007).

*Vibrio parahaemolyticus* tem sido o agente causador de três síndromes clínicas, a gastroenterite, infecções em ferimentos e septicemia. A gastroenterite é normalmente acompanhada por sintomas que incluem vômitos, diarreias, dor de cabeça, náuseas, febre baixa e câimbras abdominais (ALIPOUR; ISSAZADEH; SOLEIMANI, 2014). Em concentrações de  $10^6$ - $10^9$  UFC/g geralmente é auto-limitada. O período médio de incubação para a infecção é de 15 horas (SANTOS; VIEIRA, 2013).

Cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* podem ser diferenciadas a partir de estirpes não patogênicas com base em sua capacidade de produzir uma hemolisina termoestável direta codificada pelo gene *tdh*, cuja produção é denominada de fenômeno de Kanagawa (YOON et al., 2008) e a hemolisina termoestável relacionada, codificada pelo gene *trh* (COSTA-SOBRINHO et al., 2011). Em mamíferos, a *tdh* atua como uma enterotoxina, sendo um dos principais fatores de virulência da bactéria (HONGPING et al., 2011).

Mundialmente, *V. parahaemolyticus* é um importante patógeno de origem alimentar, sendo reconhecido como a principal causa de gastroenterite humana associada ao consumo de frutos do mar (HOSSAIN; KIM; KONG, 2013). Cerca de 5% dos isolados são patogênicos para os seres humanos (HONGPING et al., 2011).

Em 2006, surtos por *V. parahemolyticus* associados ao consumo de mariscos crus resultou em um total de 177 casos de infecção em três estados nos Estados Unidos (YOON et al., 2008). Já em 2013, a bactéria foi responsável por surtos alimentares em 13 estados, com predominância para o sorotipo O4:K12 (CDC, 2013).

No Japão, América do Norte e sudeste da Ásia *V. parahaemolyticus* tem sido responsável pela maioria dos casos de intoxicação alimentar devido ao consumo de frutos do mar (HONGPING et al., 2011). No Ceará, Brasil, esta bactéria foi responsável por um surto de gastroenterite envolvendo 26 indivíduos devido à ingestão de caranguejo cru em um restaurante da região (SANTOS; VIEIRA, 2013).

### **4.3. *Vibrio cholerae***

O *Vibrio cholerae* ocorre naturalmente em água doce e salobra em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (SANTOS; VIEIRA, 2013). A água se destaca por ser um dos principais veículos na transmissão e ecologia da doença, sendo capaz de causar surtos de proporções endêmicas, epidêmicas e pandêmicas (GOEL et al., 2010).

A sua classificação é baseada em sorogrupos ou sorovares e tem como base os seus antígenos somáticos (antígenos O), de modo que até o momento, já foram identificados 206. Os sorogrupos O1 e O139 toxigênicos têm sido diretamente associados à cólera, a epidêmica (O1 e O139) e a pandêmica (O1) (RAYCHOUDHURI et al., 2009). Os demais sorogrupos possuem as mesmas características morfológicas e bioquímicas dos sorogrupos O1 e O139, porém, só aglutinam com seus anti-soros específicos, por este motivo, ficaram conhecidos como não-O1 e não-O139 (SÁ, 2009).

*Vibrio cholerae* O1 pode ser classificado em dois biótipos, Clássico e El Tor. Quando causada pelo biótipo clássico a infecção tende a ser mais grave (SANTOS; VIEIRA, 2013). Fatores antigênicos permitem a diferenciação desses biótipos em três sorotipos, Ogawa, Inaba e Hikojima, sendo este último raro (RISTORI et al., 2006).

As primeiras seis pandemias de cólera foram atribuídas ao biótipo clássico. Ao longo da última década, novas variantes de cepas de *V. cholerae* O1 biótipo El

Tor expressando a toxina da cólera foram documentadas. As primeiras variantes de El Tor foram identificadas pela primeira vez em 2002, em Bangladesh. Estas exibiam características fenotípicas e genéticas do biótipo clássico e expressavam concentrações maiores de toxina da cólera do que as estirpes típicas El Tor (ISMAIL et al., 2013).

A patogênese da cólera é um processo complexo que envolve ações sinérgicas de vários genes, dentre eles *ompW* (proteína da membrana externa), *ctx* (toxina colérica), *tcp* (corregulador da toxina pilus), *zot* (toxina zonula occludens) e *rfbO1* (antígeno somático) (GOEL et al., 2007).

A maioria das cepas ambientais é classificada em não-O1 e não-O139, contudo, algumas estirpes de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 têm sido capazes de causarem gastroenterites ou infecções extra-intestinais em humanos (ULLOA et al., 2011).

Em reservatórios aquáticos é possível ocorrer à conversão de um sorogrupo em outro, proveniente de recombinações homólogas (BLOKESCH; SCHOOLNIK, 2007), mutação e/ou rearranjo, como ocorrido com a linhagem Bengal O139 (LI et al., 2002).

O primeiro relato na literatura de transmissão de *V. cholerae* O1 biótipo El Tor por ingestão de ostras cruas foi descrito em 1986, na Flórida, EUA. Surto de cólera têm sido descritos mundialmente, assim como o seu reaparecimento em regiões que já se encontravam livres (RISTORI et al., 2006). Segundo Gonçalves et al. (2004) peixes e mariscos foram responsáveis por epidemias ou casos isolados de cólera nos Estados Unidos, Itália, Portugal e Austrália, entre outros países.

No Brasil, entre o período de 2002 a 2003 foi isolado *V. cholerae* O1 de amostras ambientais nos municípios de Alagoas e Pernambuco. Em 2004, a cólera ressurgiu no país, com a confirmação de 21 casos autóctones. Em 2005, outros cinco casos autóctones foram registrados, todos procedentes do estado de Pernambuco (SVS, 2008).

## **5. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

Os antimicrobianos são substâncias naturais, semi-sintéticos ou sintéticos com atividade antimicrobiana, administrados aos seres humanos e animais para

diversos fins, como tratamento, prevenção e promotores de crescimento (ROLAIN, 2013).

No Brasil, a RDC 20/2011 regulamenta a utilização de antimicrobianos, sendo vetada a comercialização destes em farmácias e drogarias do país sem apresentação da receita médica (BRASIL, 2011). No Canadá, a utilização de agentes antimicrobianos também é limitada e regulamentada, dado a sua utilização excessiva (WEIR et al., 2012).

O uso extensivo e abusivo de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, agricultura e aquicultura, bem como o descarte inadequado de antimicrobianos tem causado o aumento de bactérias resistentes (CRESTANA; SILVA, 2011; MANJUSHA; SARITA, 2013), além de interferir no tratamento efetivo das infecções por estes agentes (BACCARO et al., 2002). A presença de resíduos de antibióticos favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota indígena ou potencialmente patogênica para os seres humanos (CARNEIRO et al., 2007).

A resistência aos antimicrobianos representa uma grave ameaça para a saúde pública, sendo um problema crescente no mundo, e que envolve cada vez mais espécies bacterianas e novos mecanismos de resistência (DIAZ et al., 2006).

A resistência aos antimicrobianos pode ser produzida por características inerentes às células, sendo geralmente determinada por genes cromossômicos (COSTA et al., 2008). Por outro lado, algumas estirpes podem sofrer mutações, receber plasmídeos ou transposons, genes cassetes ou outros elementos genéticos móveis e desse modo adquirir uma resistência que caracterizará novas linhagens, cuja transmissão entre as bactérias, pode ocorrer entre os indivíduos do mesmo grupo ou em diferentes grupos taxonômicos e ecológicos, contribuindo para a difusão de genes de resistência no ambiente (LAJNEF et al., 2012).

Plasmídeos têm sido encontrados em vibriões, e em alguns casos apontou-se o seu envolvimento na resistência a muitos antimicrobianos (MOLINA-AJA et al. 2002).

Bactérias resistentes aos antimicrobianos são encontradas em diferentes nichos ecológicos. O ambiente aquático é considerado como o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para a troca de

genes de resistência (CARNEIRO et al., 2007). Os ambientes aquáticos recebem quantidades significativas de antimicrobianos por meio da eliminação em águas residuais municipais e esgotos, resultante da medicação em humanos, efluentes hospitalares, bem como antimicrobianos para o uso veterinário (ZENG et al., 2011).

O estudo da resistência aos agentes antimicrobianos em micro-organismos aquáticos indígenas indica o grau de extensão da alteração dos ecossistemas pela ação do homem, principalmente quando os antimicrobianos são liberados nos esgotos pela urina, fezes e eventualmente cadáveres (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

O papel dos antimicrobianos no tratamento de infecções humanas causadas por vibrios ainda não está bem definido, apesar da resistência antimicrobiana ser um problema para a terapia direcionada a esses micro-organismos (LESLEY et al., 2011). Raissy et al. (2012) e Molina-Aja et al. (2002) relataram a utilização e resistência dos vibrios aos antimicrobianos utilizados na medicina humana e animal, como a tetraciclina, doxiciclina, estreptomicina, eritromicina, além da penicilina, ampicilina, amoxicilina, canamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol e o sulfametoxazol.

O aumento da multiresistência aos antimicrobianos em bactérias nos últimos anos é preocupante, visto que a presença de genes de resistência reforçou ainda mais a transmissão e propagação da resistência às drogas entre os patógenos microbianos (LAJNEF et al., 2012).

### **5.1. Grupo dos $\beta$ -lactâmicos**

Os  $\beta$ -lactâmicos se caracterizam por apresentar um anel  $\beta$ -lactâmico essencial para a sua atividade antibacteriana. São antimicrobianos bactericidas, que inibem a síntese da parede celular por meio da interrupção do processo de transpeptidação (MACEDO et al., 2005).

Os  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana, sendo frequentemente observado a resistência a esta classe, devido à presença de enzimas  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisá-los (PONTES et al., 2009).

As  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) apresentam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, os quais normalmente possuem atividade contra bactérias Gram-negativas (MACEDO et al., 2005). As  $\beta$ -lactamases pertencentes   classe B de Ambler são conhecidas como metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) (FIGUEREDO et al., 2009), enzimas que apresentam um largo espectro de atividade, hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (VILLEGAS et al, 2006).

As M $\beta$ LS são enzimas codificadas por genes plasmidiais e ocorrem em espécies particulares de bactérias, sendo de rápida dissemina o e vinculadas a integrons, onde a sua a o é inibida pela presença de agentes quelantes (PICOLI, 2008).

Atualmente, são conhecidas seis subclasses de M $\beta$ LS identificadas e catalogadas de acordo o local onde foram detectadas: imipenemase (IMP); Verona imipenemase (VIM); São Paulo metalo-beta-lactamase (SPM-1); German imipenemase (GIM-1); Seoul imipenemase (SIM-1) e Australian imipenemase (AIM) (FIGUEREDO et al., 2009).

Nos últimos anos genes para as M $\beta$ LS tem se espalhado a partir de *Pseudomonas aeruginosa* para estirpes da família *Enterobacteriaceae*, sendo um cenário clínico que parece estar em desenvolvimento (WALSH et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

ALIPOUR, M.; ISSAZADEH, K.; SOLEIMANI J. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. **Comparative Clinical Pathology**, Reino Unido, v. 23, p.129-133, 2014.

ARAÚJO, M.R.E.; AQUINO, C.; SEARAMAL, E.; CIOLA, C.S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M.C.C. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 302-305, 2007.

ARAÚJO, A.R.R.; SILVA, F.D.; SANTANA, R.F.; LOPES, D.F.C. Gestão da pesca de *Mytella charruana* (D' ORBIGNY, 1846) no litoral do estado de Sergipe: indicadores de sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Pesca**, São Luis, v. 4, n. 2, p. 56-70, 2009.

RODRIGUES AUGUSTO, D. S. C., **Teores de vibrios halófilos patogênicos humanos em ostras, por NMP-PCR**. 2007. 53f. (Dissertação). Universidade de Aveiro.

AUSTIN, A.; AUSTIN, D.; SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1488-1495, 2005.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 310-317, 2010.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli*

isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.

BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; PIANETTI, R.; BRUSCOLINI, F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. **Food Microbiology**, Londres, v. 18, n. 5, p. 479- 488, 2001.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v.19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BECVE, **Vigilância epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos – uma avaliação do sistema no município de São Paulo**. São Paulo, v. 2, n.10, 2012.

BLOKESCH, M.; SCHOOLNIK, G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. **PLoS Pathogens**, Estados Unidos, v. 3, n. 6, p. 81, 2007.

BRANCO, J.O.; FRACASSO, H.A.A.; JÚNIOR, F.F.; BARBIERI, E. Biodiversidade no estuário do Saco da Fazenda, Itajaí-SC. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 12-22, 2011.

BRASIL. Resolução-RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos. DOU Nº 87, Seção 1, p. 39-41. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2011.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica**. 25 ed. Artmed. 773p., 2012.

CABRERA-RODRÍGUEZ, L. E.; BRAVO-FARIÑAS, L.; RAMÍREZ-ÁLVAREZ, M.M.; LLOP-HERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ-ABREU, A.; MORIER, L.; BORREGO-HERNÁNDEZ, G. Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de

virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. **Revista Biomédica**, Yucatan, v.19, n. 3, p. 138-144, 2008.

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

CARDOSO JUNIOR, L. de O.; LAVANDER, H. D.; SILVA NETO, S. R. da; SOUZA, A. B. de, SILVA, L. O. B. da; GÁLVEZ, A. O. Crescimento da ostra *Crassostrea rhizophorae* cultivada em diferentes densidades de estocagem no Litoral Norte de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v.17, n. único, p. 10-14, 2012.

CARINAI, A.; PIANO, A.; CONSOLANDI, C.; SEVERGNINI, M.; CASTIGLIONI, B.; CAREDDA, G.; CANDELA, M.; SERRATORE, P.; BELLIS, G.; TINTI, F. Detection and characterization of pathogenic vibrios in shellfish by a ligation detection Reaction-Universal Array approach. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.153, n. 3, p. 474-482, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Increase in *Vibrio parahaemolyticus* illnesses associated with consumption of shellfish from several Atlantic coast harvest areas, United States. Base de dados: <http://www.cdc.gov/vibrio/investigations/vibriop-09-13/map.html>. Acesso 05 de janeiro de 2013.

COSTA-SOBRINHO, P. DE S.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 1, p. 137-140, 2011.

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. Susceptibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de

camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

CRESTANA, G. B.; SILVA, J. H. Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado. **Revista Internacional de Direito e Cidadania**, Erechim, n. 9, p. 55-65, 2011.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

DÍAZ, R. A. J.; PITA, M. T. S.; ALEMÁN, Z. W.; RUBALCABA, S. C.; GONZÁLEZ, M. I. G.; ROSA, O. E. D.; SALAZAR, M. C. R. Sensibilidad antimicrobiana em bacterias de origen ambiental. **Revista Higiene y Sanidad Ambiental**, Granada, n. 6; p.150- 159, 2006.

DUÉ, A.; COSTA, M. M. DA S., SILVA FILHO, E.A., GUEDES, E. A. C. Itens alimentares de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) cultivadas em um estuário tropical, no Nordeste do Brasil. **Bioikos**, Campinas, v. 24, p. 83-93, 2010.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Vibrio**. Base de dados: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>. Acesso: 15 dez. de 2013.

ESPIÑEIRA, M.; ATANASSOVA, M.; VIEITES, J.M.; SANTA CLARA, F.J. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. **Food Microbiology**, Londres, v. 27, n.1, p.122-131, 2010.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SOUSA, O.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 2, n. 2, p. 17-29, 2008.

FAO/WHO. **Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, “Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood”, Ad hoc expert consultations on risk assessment of microbiological hazards in foods, WHO Headquarters, Geneva, p. 23-27, 2001.**

FIGUEIREDO, D. Q. de, CASTRO, L. F. S., SANTOS, K. R. N., TEIXEIRA, L. M.; MONDINO, S. S. B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Catete, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

FONTOURA, M., ARAUJO, T.; SANCHES, L. **Caracterização geral do município de São Francisco do Conde. São Francisco do Conde: Prefeitura Municipal de São Francisco do Conde.** 22p. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/22932852/135843512/name/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o+de+S%C3%A3o+Francisco+do+Conde+atualizado+08+out+2009.pdf>>, 22p., 2009.

FORCELINI, H.C.D.L.; KOLM, H.E.; ABSHER, T.M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em ostras comercializadas no mercado municipal de Guaratuba, Paraná – Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 275 - 283, 2009.

GAVA, A. J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 2008.

GOEL, A.K.; PONMARIAPPAN, S.; KAMBOL, D.V.; SINGH, L. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and Non-O1 *Vibrio cholerae*. **Folia Microbiologica**, Holanda, v. 52, n. 1, p. 81-85, 2007.

GOEL, A.K.; JAIN, M.; KUMAR, P.; JIANG, S.C. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. **World journal of microbiology & biotechnology**, Alemanha, v. 26, n. 2, p. 281-287, 2010.

GONÇALVES, E. G. R.; LOPES, M. J. S.; OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. Associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton de águas estuárias da Baía de São Marcos/São Luis - MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 318-323, 2004.

HONGPING, W.; JILUN, Z.; TING, J.; YIXI, B.; XIAOMING, Z. Insufficiency of the kanagawa hemolytic test for detecting pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai, China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2011.

HOSSAIN, M.T.; KIM, Y.-O.B; KONG, I.-S. Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the groEL, tdh and trh genes. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 27, n. 5-6, p. 1-5, 2013.

ISMAIL, H.; SMITH, A.M.; TAU, N.P.; SOOKA, A.; KEDDY, K.H. Cholera outbreak in South Africa, 2008–2009: Laboratory analysis of *Vibrio cholerae* O1 strains. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 208, n. 1, p. 39-45, 2013.

ISLAM, M. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 48, n. 7-8, p. 624-649, 2004.

IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B. E.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 399-411, 2010.

JAY, J. M. (2005) **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. São Paulo: Arned, 711 p.

KANUNGO, S.; SUR, D.; ALI, M.; YOU, Y.A.; PAL, D.; MANNA, B.; NIYOGI, S.K.; SARKAR, B.; BHATTACHARYA, S.K.; CLEMENS, J.D.; NAIR, G.B. Clinical, epidemiological, and spatial characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea and cholera in the urban slums of Kolkata, India. **BMC Public Health**, Londres, v. 12, n. 1, p. 830, 2012.

LESLEY, M. B., VELNETTI, L., CHEAH, Y. K., SON, R., KASING, A., SAMUEL, L., MICKY, V.; NISHIBUCHI, M. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. **International Food Research Journal**, Barking, v. 18, n.3, p. 1183-1188, 2011.

LAJNEF, R.; SNOUSSI, M.; ROMALDE, J. L.; NOZHA, C.; HASSEN, A. Comparative study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from four Tunisian marine biotopes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 3345-3363, 2012.

LI, M.; SHIMADA, T.; MORRIS JR, J. G.; SULAKVELIDZE, A.; SOZHAMANNAN, S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2441-2453, 2002.

LOITZENBAUER, E.; MENDES, C. A. B. A dinâmica da salinidade como uma ferramenta para a gestão integrada de recursos hídricos na zona costeira: uma aplicação à realidade brasileira. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, Lisboa v. 11, n. 2, p. 233-245, 2011.

MACEDO, M. de L. de A.P.; CARTAXO, R. de S.; ALMEIDA, T. C. da C.; SOUZA, L. B. S. de; W. J. S.; COUTINHO, H.D.M. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 59-63, 2005.

MANJUSHA, S.; SARITA, G. B. Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. **International Food Research Journal**, Barking, v. 20, n. 1, p. 77-86, 2013.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A.; BUSATO, M. A. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 401-407, 2011.

MASINI, L.; GRANDIS, G. de; PRINCIPI, F.; MENGARELLI, C.; OTTAVIANI, D. Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). **Water Research**, New York, v. 41, n. 18, p. 4031-4040, 2007.

MOLINA-AJA, A., GARCÍA-GASCA, A., ABREU-GROBOIS, A., BOLÁN-MEJÍA, C. ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B., Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 213, p.7-12, 2002.

NAIR, G.B.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S.K.; DUTTA, B.; TAKEDA, Y.; SACK, D.A. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 1, p. 39-48, 2007.

NASCIMENTO, A. M. A. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. **Microbial Ecology**, New Jersey, v. 58, n. 4, p.762-772, 2009.

NASCIMENTO, V. A.; MITTARAQUIS, A. S. P.; TRAVÁLIA, B. M.; SANTOS, R. C. A.; NUNES, M. L.; AQUINO, L. C. L. Qualidade Microbiológica de moluscos bivalves - sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2011.

O'HIGGINS, T. G.; FERRARO, S. P.; DANTIN, D. D.; JORDAN, S. J.; CHINTALA, M. M. Habitat scale mapping of fisheries ecosystem service values in estuaries. **Ecology and Society**, Canadá, v. 15, n. 4, p. 7, 2010.

OLIVEIRA, A. B. A. de; PAULA, C. M. D. de; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. de I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLGUNOGLU, I. A. **Salmonella in Fish and Fishery Products, Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen**. Base de dados: Available from:<http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/salmonella-in-fish-andfishery-products>. p. 91-105, 2012.

PASQUAUDA, S.; BÉGUER, M.; LARSENA, M. H.; CHAALALI, A.; CABRAL, H.; LOBRYA, J. Increase of marine juvenile fish abundances in the middle Gironde estuary related to warmer and more saline waters, due to global changes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, v. 104-105, n. 1, p. 46-53, 2012.

PICOLI, S. U. Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 273-277, 2008.

PEREIRA, O. M.; HILBERATH, R. C.; ANSARAH, P. R. A. C.; GALVÃO, M. N. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do estuário de Ilha Comprida - SP- Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 139-149, 2003.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação

Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciências Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 27, n. 2, p. 387-390, 2007.

PONTES, D. S.; PINHEIRO, F. A.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; GUEDES, R. L. M.; CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F. R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. **Microbial Ecology**, New Jersey, v. 58, n.4, p. 762-772, 2009.

RAGHUNATH, P.; ACHARYA, S.; BHANUMATHI, A.; KARUNASAGAR., I.; KARUNASAGAR, I. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. **Food Microbiology**, Londres, v. 25, p. 824-830, 2008.

RAYCHOUDHURI, A.; TAPAS, P., KAUSIK, G.; THANDAVARAYAN, R.; NANDY, R.K.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B.; MUKHOPADHYAY, A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, Índia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n.1, p. 131-132, 2009.

RAISSY, M., MOUMENI, M., ANSARI, M.; RAHIMI, E. Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Iran, v. 11, n. 12, p. 618-626, 2012.

RIOS, E. C. **Compendium of brazilian sea shells**. Rio Grande, Porto Alegre, 2009. 668 P.

RISTORI, C. A.; ROWLANDS, R. E. G.; JAKABI, M.; GELLI, D. S.; SCOLA, M.C.G.; GASPARI, E. N. Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 2, p.127-132, 2006.

ROCHA, R. S. **Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e preliminar de virulência entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do**

**estuário do rio Acaraú, Ceará, Brasil.** 2011. 85f. (Dissertação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, L. de A.P. **Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía de Todos os Santos.** 2009. 174f. (Dissertação). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ROLAIN, J.-M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontier sin Microbiology**, Switzerland, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2013.

SÁ, L. L. C. **Diversidade Genética de Isolados Ambientais de *Vibrio cholerae* da Amazônia Brasileira, Belém-Pará.** 2009. 147f. (Tese). Universidade Federal do Pará, Belém.

SANTOS, C. A. M. L. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária- 37º. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 26-30, 2010. Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, L. F. P. Avaliação dos teores de cádmio e chumbo em pescado proveniente de São Francisco do conde, Bahia. 75p (Dissertação), Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, 2011.

SANTOS, C. A. M. L.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 219-228, 2013.

SOUSA, O. V. de; VIEIRA, R. H. S. dos F.; MENEZES, F. G. R. de; REIS, C. M. F. dos,; HOFER, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.46, n. 2, p.59-62, 2004.

SVS- Secretária de Vigilância Sanitária. **Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera**, Editora MS, Brasília, p. 168, 2008.

ULLOA, F. M. T.; PORTE, T. L.; BRAUN, J. S.; DABANCH, P. J.; FICA, C. A.; HENRÍQUEZ, A. T.; OSORIO, A. C. G. Gastroenteritis aguda causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad Vpal-7. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v. 28, n. 5, p. 470-473, 2011.

VIEIRA, R. H. S. dos F.; ATAYDE, M. A.; CARVALHO, E. M. R.; CARVALHO, F. C. T. de; FONTELES FILHO, A. A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; OLIVEIRA, M. R.; SUAREZ, C. J.; CORREA, A.; QUEENAN, A. M.; QUINN, J. P. First Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 50, n.1, p. 226-229, 2006.

WALSH, T. R.; BOLMSTROM, A.; QWARNSTROM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2755-2759, 2002.

WEIR, M.; RAJIC, A.; DUTIL, L.; UHLAND, C.; BRUNEAU, N. Zoonotic bacteria and antimicrobial resistance in aquaculture: Opportunities for surveillance in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 619-620, 2012.

YOON, K. S.; MIN, K. J.; JUNG, Y. J.; KWON, K. Y.; LEE, J. K.; OH, S. W. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and non

pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea, **Food Microbiology**, Londres, v. 25, n. 5, p. 635-641, 2008.

ZANETTI, S.; SPANU, T.; DERIU, A.; ROMANO, L.; SECHI, L. A.; FADDA, G. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Londres, v. 17, n. 5, p. 407-409, 2001.

ZHENG, S.; QIU, X.; CHEN, B.; YU, X.; LIU, Z.; ZHONG, G.; LI, H.; CHEN, M.; SUN, G.; HUANG, H.; YU, W.; FREESTONE, D. Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: source, distribution and bacterial resistance. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n.11, p.1677-1685, 2011.

---

## **CAPÍTULO 2**

**Caracterização da resistência antimicrobiana e perfil de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de água e moluscos bivalves**

---

Este artigo será submetido à revista Food Microbiology.

# CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM AMOSTRAS DE ÁGUA E MOLUSCOS BIVALVES

Irana Paim Silva<sup>1</sup>, Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>2</sup>, Oscarina Viana de Sousa<sup>3</sup>;  
Carla da Silva Silveira<sup>4</sup>

<sup>1,4</sup>Mestranda em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB/Embrapa Mandioca e Fruticultura.

<sup>2</sup>Professora Adjunto - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

<sup>3</sup>Professora Adjunto - Universidade Federal do Ceará - UFC

## RESUMO:

Este estudo objetivou caracterizar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e fatores de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de água e moluscos bivalves no estuário de São Francisco do Conde, Bahia, Brasil. Mensalmente durante 15 meses foram realizadas coletas de água em três pontos do estuário (45 amostras), ostras e sururus (30 amostras *in natura* e 15 processado). A identificação bioquímica das estirpes foi realizada de acordo com chave de identificação para cepas ambientais. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados com 11 fármacos de sete famílias, além da concentração inibitória mínima (CIM) e produção de enzimas metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ LS). Para a caracterização fenotípica de virulência foram usados os testes de produção de exoenzimas (amilase, caseinase, DNase, fosfolipase, gelatinase, lipase e urease), atividade hemolítica, bem como identificação genotípica pela técnica multiplex-PCR com os iniciadores *tdh* e *trh*. Foram identificadas 10 espécies, sendo 67% (30/45) pertencentes ao *V. parahaemolyticus* (38% de água, 18% de bivalves *in natura* e 11% de sururu processado). Resistência antimicrobiana foi verificada em pelo menos um dos 11 antimicrobianos testados, com elevado percentual para a ampicilina (97%) (55% em isolados da água, 27% em bivalves *in natura* e 17% em sururu processado) e CIM de 400  $\mu$ g, seguido de cefalotina (93%) (53% em isolados de água, 28% em bivalves *in natura* e 18% em sururu processado) e CIM de  $\leq$  100  $\mu$ g. Multiresistência foi observada em 59% das cepas da água, 75% dos bivalves *in natura* e em 20% do sururu processado. Todos os isolados foram

produtores da enzima M $\beta$ LS. Para o perfil fenotípico de virulência o maior percentual de positividade foi para amilase (97%), seguido pela DNase (83%), fosfolipase (70%), atividade  $\beta$ -hemolítica (57%), gelatinase (43%), lipase (13%) e caseinase (7%), não sendo relatado atividade da exoenzima urease. Não foram detectados os genes de virulências *tdh* e *trh* nas estirpes analisadas. Em geral, cepas ambientais são de difícil caracterização, visto que vivem em um ambiente de intensas variações, podendo inserir ou excluir caracteres. A elevada resistência microbiana e produção de M $\beta$ LS em *V. parahaemolyticus* demonstra que o ambiente em estudo vem sofrendo com a pressão antrópica. Além disso, embora não tenha sido verificado a expressão de genes de virulência *tdh* e *trh*, a elevada produção de exoenzimas facilita a invasão e lesão dos tecidos do hospedeiro pelo micro-organismo, não descartando o potencial toxigênico.

**Palavras chave:** Ostras, sururu, saúde pública, metalo- $\beta$ -lactamase.

#### CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE PROFILE OF *Vibrio parahaemolyticus* IN WATER SAMPLES AND CLAMS BIVALVES

##### ABSTRACT:

This study aimed to characterize the profile of antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* in samples of water and bivalve molluscs in the estuary of São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. Each month during 15 months water sampling were performed at three points of the estuary (45 samples), oysters and mussels (30 samples *in natura* and 15 processed). The biochemical identification of the strains was performed according to identification key for environmental strains. The antimicrobial susceptibility tests were performed with 11 drugs of seven families in addition to minimum inhibitory concentration (MIC) and production of enzymes metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ LS). For phenotypic characterization of virulence were used tests of exoenzymes production (amylase, caseinase, DNase, phospholipase, gelatinase, lipase and urease), hemolytic activity, as well as genotypic identification by multiplex-PCR technique with the indicators *tdh* and *trh*. 10 species were identified, of which 67% (30/45) belonging

to *V. parahaemolyticus* (38% of water, 18% of bivalves *in natura* and 11% of processed mussel). Antimicrobial resistance was detected in at least one of the 11 antimicrobials tested, with a high percentage for ampicillin (97%) (55% in isolates of water, 27% in *in natura* bivalves and 17% in processed mussel) and MIC of 400 µg, followed by cephalothin (93%) (53% in isolates of water, 28% in *in natura* bivalves and 18% in processed mussel) and MIC of ≤ 100 µg. Multidrug resistance was observed in 59% of the strains from water, 75% of the *in natura* bivalves and 20% of the processed mussel. All the isolates were producers of the enzyme MβLs. For the phenotypic profile of virulence the highest percentage of positivity was for amylase (97%), followed by DNase (83%), phospholipase (70%), β-hemolytic activity (57%), gelatinase (43%), lipase (13%) and caseinase (7%), not being reported activity of the urease exoenzyme. No virulence genes *tdh* and *trh* were detected in the strains analyzed. The high microbial resistance and production of MβLs in *V. parahaemolyticus* demonstrates that the environment under study has been suffering with anthropogenic pressure. Furthermore, although not verified the expression of virulence genes *tdh* and *trh* the high exoenzyme production facilitates the invasion and injury of host tissues by micro-organisms, not ruling out the possibility of becoming pathogenic.

**Keywords:** oysters, mussels, public health, metallo-β-lactamase.

## 1. Introdução

Os vibrios são bactérias naturais em ambientes marinhos e estuarinos (SOUSA et al., 2004), pertencentes a família *Vibrionaceae*, Gram-negativos, geralmente móveis, mesofílicos e anaeróbios facultativos (AUSTIN et al., 2005). Dentre as espécies patogênicas do grupo, se destacam o *Vibrio parahaemolyticus* e o *V. cholerae* (COLLIN; REHNSTAM-HOLM, 2011).

Atualmente, esse gênero compreende 102 espécies (DSMZ, 2013). Dentre elas, pelo menos 13 são passíveis de causarem infecções em humanos, estando à maioria dos relatos associado ao *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (FAO/WHO, 2001). As espécies de *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* têm recebido maior atenção na última década por causarem doenças em animais aquáticos (MANJUSHA; SARITA, 2013).

A principal característica deste grupo de bactérias é a capacidade de causar intoxicação alimentar grave associada ao consumo de peixes e mariscos contaminados crus ou mal cozidos (ESPIÑEIRA et al., 2010). De acordo com o Centro Norte-Americano para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) os peixes e mariscos são responsáveis por 5% dos casos individuais e 10% de todos os surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVAs). A maioria dos surtos são decorrentes do consumo de moluscos (OLGUNOGLU, 2012). Entre 1988 a 1997, uma revisão sobre infecções ocasionadas por *V. parahaemolyticus* mostrou que 88% dos pacientes com gastroenterite e 91% com septicemia relataram ter ingerido ostras cruas (KANUNGO et al., 2012).

A patogênese das infecções causadas pelos vibrios é complexa e relacionada com uma variedade de fatores de virulência, como citotoxinas, enterotoxinas, enzimas líticas e a produção de polissacarídeo capsular, além de hemaglutinina (MASINI et al., 2007; CABRERA-RODRIGUES et al., 2008).

*Vibrio parahaemolyticus* representa uma bactéria considerada emergente devido a sua associação com surtos epidêmicos após o consumo de alimentos, em especial, pescados e moluscos consumidos *in natura* ou parcialmente submetidos à cocção (PEREIRA et al., 2007).

Cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* podem ser detectadas com base em sua capacidade de produzir uma hemolisina termoestável direta e a

hemolisina termoestável relacionada (YOON et al., 2008; COSTA-SOBRINHO et al., 2011) codificadas pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente (RAGHUNATH et al., 2008). O gene *tdh* produz uma enterotoxina em mamíferos, considerado um importante fator de virulência para o *V. parahaemolyticus* (HONGPING et al., 2011).

Entre os surtos de origem alimentar ocorridos em 13 províncias da China em 2003, cerca de 40% dos pacientes se encontravam infectados com *V. parahaemolyticus* (NAIR et al., 2007). No Brasil, existem alguns relatos de isolamento de *V. vulnificus* em mariscos, principalmente ostras, e demais frutos do mar comercializados em São Paulo, Bahia e Ceará (ARAUJO et al., 2007).

O papel dos antimicrobianos no tratamento de infecções humanas causadas por *vibrios* ainda não está bem definido, apesar de a resistência antimicrobiana ser um problema para a terapia direcionada a esses micro-organismos (LESLEY et al., 2011). Os  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais utilizados, sendo frequente a resistência observada a esta classe, devido à presença de enzimas capazes de hidrolisá-los (PONTES et al., 2009). Dentre as enzimas, as metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) apresentam um largo espectro de atividade, hidrolisando as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (VILLEGAS et al., 2006, PONTES et al., 2009).

O município de São Francisco do Conde é uma área de intensa extração de moluscos bivalves, que apresenta um índice de desenvolvimento econômico entre os três melhores do estado da Bahia devido à extração de petróleo na região. No entanto, índices como a educação e a saúde encontram-se entre os piores (FONTOURA et al., 2009).

São Francisco do Conde responde por 40% do abastecimento de água da região metropolitana, sendo considerado uma área de proteção ambiental (SANTOS, 2011). Entretanto, a degradação do ambiente na região contribui para a poluição das águas, solo e ar (FONTOURA et al., 2009). Tendo em vista a importância epidemiológica dos *vibrios*, bactérias indígenas em ambientes estuarinos, este estudo teve como objetivo verificar o perfil de suscetibilidade e fatores de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de água e moluscos bivalves no estuário de São Francisco do Conde, Bahia, Brasil.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Local e coleta das amostras**

Durante o período de setembro de 2010 a fevereiro de 2012 foram realizadas 15 coletas mensais de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, em três diferentes pontos do estuário: ponto P1 (Vila Caeira - S 12° 33' 52.4"/ W038°41' 40.5"), ponto P2 (São Bento - S 12° 35' 35.8"/ W 038°41' 47.7") e ponto P3 (Ilha de Cajaíba - S 12° 37' 52.9"/ W038°40' 55.0"), totalizando 45 amostras de água. Para as amostras de moluscos bivalves *in natura* foram analisadas 15 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e 15 de sururu (*Mytella guyanensis*), além de 15 amostras de sururu processado (cocção branca) comercializado no mercado municipal de São Francisco do Conde.

Em cada coleta foram obtidos 83 indivíduos de ostra e 70 indivíduos de sururu, totalizando a análise de 1.245 ostras e 1.050 sururus. O sururu processado foi adquirido de diversos comerciantes no mercado municipal do município, em porções de 0,5 kg. As amostras de água foram coletadas em frascos âmbar de 1.000 mL. Todas as amostras foram acondicionadas em gelo e transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, Brasil e analisados em um intervalo máximo de quatro horas.

### **2.2. Análises microbiológicas**

O pré-enriquecimento das amostras foi realizado em água peptonada alcalina (APA) contendo 1% de NaCl e pH 8,5. Para a análise da água 100 mL da amostra foi adicionado a 100 mL de APA em concentração dupla de acordo com o *Bacteriological Analytical Manual* - BAM descrito por Silva et al. (2011). Em seguida, uma alíquota do material foi estriado em placas contendo ágar Tiosulfato Citrato Bile e Sacarose (TCBS) e incubadas a 37°C por 24 h, sendo avaliada a capacidade de hidrolise ou não da sacarose como uma das características morfológica de seleção das cepas.

Para os bivalves *in natura*, em condições assépticas foi realizada a abertura das conchas e retirado 25 g do músculo e líquido intervalvar. As amostras foram

adicionadas a 225 mL de caldo APA e incubadas a 37°C por 18 h ± 2 h, uma alíquota do material foi estriado em placas contendo ágar TCBS e incubadas a 37°C por 24 h. O mesmo procedimento foi realizado para o sururu processado.

Para a identificação fenotípica das estirpes foi usada a chave de identificação de Nogueroles e Blanch (2008).

### **2.3. Extração de DNA total**

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo de extração de Sambrook et al. (1989) com modificações. Inicialmente, as cepas foram cultivadas em Caldo Tripton Soja (TSB) a 1% de NaCl e pH 8,5 por 24 h. Posteriormente 2 mL da cultura foram transferidos para tubos de *ependorf* e congeladas. Após 30 minutos de congelamento o material foi descongelado e centrifugado (5.000 rpm/10min.), descartado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada estéril e novamente centrifugado.

O *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de tampão de extração adicionado de lisozima (0,15 M NaCl, 50 Mm Tris-HCL, 10 mM EDTA, 2% SDS, pH 8,0) e incubado por 1 h a 65°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 e 0,5 mL de acetato de potássio 0,5 M e centrifugado (10.000 rpm/15min.). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de *ependorf* onde o DNA foi precipitado com 1 volume de álcool isopropílico gelado e centrifugado (10.000 rpm/15min.). O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 80% gelado, centrifugado e seco *over night*. O DNA foi ressuspenso em 0,1 mL de TE (10 Mm Tris-HCL; 1 Mm e EDTA) e estocado a -20°C.

#### **2.3.1. Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

Para a detecção da virulência de *V. parahaemolyticus* o DNA total extraído foi amplificado pela técnica multiplex-PCR usando os iniciadores específicos conforme tabela 1.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados na caracterização molecular dos isolados de *V. parahaemolyticus*.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Amplicons (pb)	Fonte
<i>tdh</i>	F: 5'-gta aag gtc tct gac ttt tgg ac-3' R: 5'-tgg aat aga acc ttc atc ttc acc-3'	269	Bej et al. (1999)
<i>Trh</i>	F:5'-ttg gct tcg ata ttt tca gta tct-3' R:5'-cat aac aaa cat atg ccc att tcc g-3'	500	

*tdh* (Hemolisina direta termoestável); *trh* (Hemolisina direta termoestável-relacionada); pb (Par de bases).

A especificidade da PCR multiplex foi determinada usando uma cepa padrão de *V. parahaemolyticus* (IOC 17802) cedida pelo Instituto de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará. O ensaio do PCR foi realizado pela adição do DNA alvo a uma mistura reacional de 25 µL conforme tabela 2 (BEJ et al., 1999).

**Tabela 2.** Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de *V. parahaemolyticus*.

Reagentes da Reação	PCR- Multiplex
	<i>tdh, trh</i>
Tampão	5 µL
dNTP's	0,5 µL
Iniciador F	1,0 µL*
Iniciador R	1,0 µL*
MgCl <sub>2</sub>	1,0 µL
Taq polimerase	0,2 µL
H <sub>2</sub> O	10,3 µL
DNA total	4 µL
Volume da reação	25 µL

\*Valor para cada *primer* utilizado.

Os produtos da extração de DNA e do PCR foram submetidos ao método de eletroforese em gel de agarose 1,5% com adição de *Gel red* para visualização dos produtos amplificados em transluminador. As corridas ocorreram com

voltagem de 150V, amperagem de 400mA, e duração de aproximadamente 60 minutos. Os géis foram documentados em sistema de foto documentação digital Kodak EDAS290.

#### **2.4. Suscetibilidade antimicrobiana**

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão de disco em placas, seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

Para o antibiograma, as colônias de *V. parahaemolyticus* foram repicadas em meio Triptona Soja Agar (TSA) inclinado e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alçada da cultura foi resuspensa em 9 mL de salina 0,85% até que a densidade bacteriana lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 ( $10^8$  UFC/mL) (CLSI, 2010). Após o ajuste, o inóculo foi espalhado no meio ágar Mueller-Hinton e adicionado os discos de antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e posteriormente seus halos de inibição medidos usando paquímetro digital. Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), cefalotina, ceftazidime (30 µg), ciprofloxacina, cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), nitofurantoína (300 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg). Para controle foi utilizado uma cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

As estirpes que apresentaram resistência aos antimicrobianos determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), em intervalos de 10 em 10, iniciando na concentração imediatamente superior a do disco comercial (CLSI, 2003).

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (índice MAR) será calculado como o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de antimicrobianos testados, multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentuais (HIRSCH et al., 2006).

#### **2.5. Resistência mediada por plasmídios-R**

A presença ou ausência de plasmídios-R foi testada para as cepas que apresentaram perfil de multirresistência. Como agente de cura foi utilizado o Alaranjado de Acridine (AA) na concentração de 100 µg/mL. Após crescimento em caldo nutriente a 37°C por 24 h, alíquotas de 200 µL foram adicionadas aos tubos

contendo caldo Luria Bertani (LB) (controle) e caldo LB + AA e incubados a 37°C por 24 h. Após essa etapa, as culturas foram submetidas novamente ao antibiograma (MOLINA-AJA et al., 2002).

As cepas que apresentaram perfil de resistência plasmidial foi realizada a extração do DNA plasmidial usando Kit "Plasmid Mini Kit I" (Omega/Bio-Tek®).

O produto da extração foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8% com *Gel red*, com voltagem de 80V, duração de 4 horas. Para visualização em transiluminador com luz ultravioleta. Os géis foram documentados em sistema de foto documentação digital L-pix (Locus Biotecnologia).

## **2.6. Produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS)**

As culturas de *V. parahaemolyticus* resistentes ao imipenem foram submetidas à avaliação da produção da enzima M $\beta$ LS por meio do método de disco-aproximação de acordo com os protocolos propostos por Figueiredo et al. (2009) com modificações.

Após a padronização do inóculo ( $10^8$  UFC/mL) em espectrofotômetro a suspensão foi semeada usando *swab* estéril em placas de agar Mueller-Hinton com 17 mL. Em seguida, discos contendo imipenem (10  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g) e discos impregnados com 3  $\mu$ l de uma solução de ácido 2-mercaptopropionico (MPA) (1,2 g/ml) e 10  $\mu$ l de uma solução 0,5 M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (pH 8) foram posicionados na placa. As distâncias (centro a centro) entre os discos de antimicrobianos e os discos que receberam os agentes quelantes foram de 1,5 cm (disco contendo EDTA) e de 2 cm (disco contendo MPA). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. A observação de um halo ou do aumento do tamanho do halo ao redor dos discos de imipenem e/ou ceftazidima localizados próximos ao disco de MPA e/ou EDTA indicava a positividade do teste.

## **2.7. Testes de virulência fenotípicos**

Foram realizadas as provas de gelatinase, caseinase, fosfolipase, lipase, urease, atividade hemolítica além dos testes de amilase e DNase (HOSGPING et al., 2011; PEREIRA et al., 2004; WAGATSUMA, 1968; CABRERA-RODRÍGUEZ et al., 2008). Em culturas bacterianas crescidos em ágar TSA a 1% de NaCl e suplementados com 0,5% de gelatina, 5% de leite pó desnatado (caseína), 1% de

gema de ovo, 1% de Tween 80, solução de 20% de eritrócitos de carneiro, 0,1% de amido, ágar Dnase acrescido de 0,01% azul de toluidina, respectivamente. A formação de um halo transparente ou opalescente indicava a positividade dos testes.

### 3. Resultados e Discussão

Foram identificados fenotipicamente 10 espécies de *Vibrio* (Tabela 3), destacando-se as estirpes de *Vibrio cholerae* (6) e *V. parahaemolyticus* (30) com importância clínica, bem como espécies associadas à zoonoses em animais aquáticos como *V. crassostreae* (AUSTIN et al., 2005), *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii* (AUSTIN, 2010) e *V. coralliilyticus* (POLLOCK et al., 2010).

**Tabela 3.** Espécies de *Vibrio* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Amostras	Origem	Espécies	Percentual % (nº/total)
Água	Ponto 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	24 (6/25)
		<i>V. pelagius</i>	04 (1/25)
		<i>V. alginolyticus</i>	04 (1/25)
		<i>V. cholerae</i>	12 (3/25)
	Ponto 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	28 (7/25)
	Ponto 3	<i>V. coralliilyticus</i>	04 (1/25)
<i>V. parahaemolyticus</i>		16 (4/25)	
<i>V. litoralis</i>		04 (1/25)	
Moluscos bivalves	Sururu	<i>V. parahaemolyticus</i>	60 (3/5)
		<i>V. cholerae</i>	40 (2/5)
	Ostras	<i>V. parahaemolyticus</i>	83 (5/6)
		<i>V. cholerae</i>	17 (1/6)
	Sururu processado	<i>V. parahaemolyticus</i>	56 (5/9)
		<i>V. ponticus</i>	11 (1/9)
		<i>V. litoralis</i>	11 (1/9)
<i>V. metschnikovii</i>		11 (1/9)	
		<i>V. crassostreae</i>	11 (1/9)

Ponto 1 (Vila Caeira), Ponto 2 (São Bento), Ponto 3 (Ilha de Cajaíba).

As amostras de água e sururu processado apresentaram a maior diversidade de espécies (Tabela 3). Os vibrios são citados como uma ameaça tanto para o cultivo de frutos do mar, como para a saúde pública (COSTA et al., 2010), por se encontrarem associados às vibrioses (RAISSY et al., 2012). A presença de vibrios no sururu processado sugere falhas higiênicossanitárias durante o seu processamento, visto que estes passam por um processo de cocção rápida para a abertura das valvas. Outro fator que pode ter contribuído para a maior diversidade microbiana desse alimento é a origem das amostras, muitas vezes, provenientes de outros municípios da região.

A presença de *V. parahaemolyticus* em amostras de peixes de água doce e marinho comercializados no mercado de Calcutá, Índia foi atribuída à contaminação cruzada nas peixarias (NAIR et al., 2007).

*Vibrio parahaemolyticus* foi à espécie predominante nos três pontos de água. No ponto P1 (Vila Caeira) área mais distante da Baía de Todos os Santos, além de *V. parahaemolyticus* foi isolado *V. cholerae* (Tabela 3). Este fato é atribuído à baixa salinidade devido a maior influencia do rio Subáe.

No Brasil, no período de 2002 a 2003 foi isolado *V. cholerae* O1 em amostras ambientais nos municípios de Alagoas e Pernambuco. Em 2004, a cólera ressurgiu no país, com a confirmação de 21 casos autóctones. Enquanto em 2005, outros cinco casos autóctones foram registrados, todos procedentes do estado de Pernambuco (SVS, 2008).

No ponto P2 (São Bento), área onde ocorre a extração de moluscos bivalves foi isolado apenas *V. parahaemolyticus*. Nesse ponto há uma flutuação da salinidade, fator requerido para o desenvolvimento do micro-organismo, em virtude da variação da maré. No ponto P3 (Ilha de Cajaíba), além de *V. parahaemolyticus* foram identificadas as espécies de *V. crassostrea*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii* e *V. coralliilyticus* (Tabela 3). Nesse ponto, o nível de salinidade era ao redor de 30‰.

*Vibrio parahaemolyticus* foi predominante em 83% das ostras *in natura*, 64% das amostras de água, 60% do sururu *in natura* e 44% do sururu processado. As ostras vivem aderidas às raízes da *Rhizophora mangle* se alimentando por filtração. Em virtude das coletas ocorrerem quase sempre em maré baixa, as ostras se encontravam com as valvas fechadas, diminuindo o processo de

depuração. Concentrações de *V. parahaemolyticus* em ostras podem ser até 100X maiores que na água (PARVEEN et al., 2008).

As falhas higienicossanitárias durante o processamento dos moluscos bivalves, contaminação cruzada nos locais de comercialização do pescado, bem como o abuso do binômio tempo x temperatura contribuem para o aumento da carga microbiana em alimentos processados. Segundo Cordeiro et al. (2007), o trinômio cocção, congelamento e armazenamento tem sido eficiente na eliminação de *V. parahaemolyticus* em amostras de mexilhão.

No Brasil, não existem limites para a presença de *V. parahaemolyticus* em pescado, o que coloca os moluscos bivalves em um grupo de risco, visto que culturalmente é grande o consumo de ostras *in natura*, principalmente na região nordeste. A falta de dados epidemiológicos no país faz com que não se tenha dados reais do número de surtos envolvendo estes alimentos.

Nos Estados Unidos no período de maio a agosto de 2013, *V. parahaemolyticus* foi responsável por surtos alimentares em 13 estados, com predominância para o sorotipo O4:K12 (CDC, 2013). No Ceará, Brasil, esta bactéria foi responsável por um surto de gastroenterite envolvendo 26 indivíduos devido à ingestão de caranguejo cru em um restaurante (SANTOS; VIEIRA, 2013).

### **3.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana**

*Vibrio parahaemolyticus* apresentou suscetibilidade a 45% dos antimicrobianos. A tetraciclina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e nitrofuratoína foram os mais eficientes no combate a este micro-organismo (Tabela 4). A suscetibilidade a tetraciclina é satisfatória por se tratar de uma das drogas escolhida no tratamento de infecções causadas por vibrios (HAN et al., 2007).

**Tabela 4.** Percentual de resistência das estirpes de *Vibrio parahaemolyticus* isolados em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Antimicrobianos	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (30)								
	Água (17)			Mb (8)			Sp (5)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos									
- Gentamicina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
$\beta$ -lactâmico									
- Ampicilina	0	24	76	0	12	88	0	20	80
- Cefalotina	12	23	65	0	37	63	0	80	20
- Ceftazidima	53	35	12	75	0	25	60	20	20
- Imipenem	94	6	0	100	0	0	100	0	0
Fenicóis									
- Cloranfenicol	100	0	0	75	0	25	80	0	20
Nitrofurânicos									
- Nitrofurântoína	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Quinolonas									
- Ác. Nalidíxico	100	0	0	100	0	0	100	0	0
- Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Sulfonamidas									
- Sulfazotrin	100	0	0	87	0	12	100	0	0
Tetraciclínas									
- Tetraciclina	100	0	0	100	0	0	100	0	0

Mb (Molusco bivalve, ostra e sururu *in natura*); Sp (Sururu processado); S (Sensível); I (Intermediário); R (Resistente).

Os aminoglicosídeos são usados no tratamento de infecções, em função de sua eficácia e o baixo custo (OLIVEIRA et al., 2006). Costa et al. (2008) relataram cepas de *Vibrio* spp. isoladas em camarões e água de cultivo suscetíveis a gentamicina e ao cloranfenicol, enquanto Raissy et al. (2012) avaliando o padrão de resistência dos vibrios relataram 83,3% dos isolados com resistência à gentamicina e 18,1% a tetraciclina, diferindo do presente trabalho.

Resistência antimicrobiana a pelo menos um dos antimicrobianos foi observada em 83% dos isolados, sendo a maior resistência observada para a classe dos  $\beta$ -lactâmicos (Tabela 4). Os  $\beta$ -lactâmicos são os fármacos de escolha

no tratamento de varias bactérias Gram-negativas. O aumento na resistência a essa classe ocorre devido à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, encontradas em cromossomos e elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, que facilitam a sua transferência (PONTES et al., 2009).

*Vibrio parahaemolyticus* apresentou elevado percentual de resistência a ampicilina (88%) e cefolatina (65%) (Tabela 4). Apesar do grupo das penicilinas ser uma das escolhas para o tratamento de DVAs (BERQUÓ et al., 2004), a ampicilina em cepas de *V. parahaemolyticus* vem demonstrando baixa eficiência no tratamento de infecções (HAN et al., 2007).

Os isolados apresentaram baixa resistência ao imipinem (carbapenema) (Tabela 4). Este fármaco é de uso restrito ao ambiente hospitalar, utilizado no tratamento de infecções causadas por Enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases. No entanto, o aparecimento de enzimas capazes de inativar as carbapenemas tem elevado a resistência microbiana, limitando as opções de tratamento (IKEDA et al., 2012).

O uso extensivo e abusivo de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal, fez com que as autoridades brasileiras no intuito de tentar minimizar a problemática da resistência antimicrobiana, limitassem o seu uso apenas com a prescrição médica. Mesmo assim, falhas no tratamento de resíduos sólidos municipais e o uso na profilaxia animal, tem contribuído para o lançamento de resíduos antimicrobianos nos corpos hídricos.

Perfil de multiresistência foi observado em 75% dos isolados de moluscos *in natura* (MAR 0,18 a 0,36), 59% da água (MAR 0,18) e 20% no sururu processado (MAR 0,27) (Tabela 5).

A falta de saneamento básico na região faz com que o rio Subaé receba um aporte contínuo de efluentes domésticos que afetam a microbiota autóctone do ambiente. Segundo Baquero et al. (2008) o estudo da resistência aos agentes antimicrobianos em micro-organismos aquáticos indígenas é importante, uma vez que indica o grau de extensão da alteração dos ecossistemas pela ação do homem, principalmente quando os antimicrobianos são liberados nos esgotos pela urina, fezes e eventualmente cadáveres.

**Tabela 5.** Multirresistência microbiana e resistência plasmidial das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Origem	Nº	Antimicrobianos	MAR	Resistência plasmidial
Água	1	CAZ	-	CAZ
	1	CAZ	-	-
	9	AMP, CFL	0,18	-
	4	AMP	-	-
	1	CFL	-	-
	1	CFL, CLO	0,18	CFL, CLO
Bivalves <i>in natura</i>	4	AMP, CFL	0,18	-
	2	AMP	-	-
	1	AMP, CFL	0,18	CFL
	1	AMP, CFL, CLO, SUT	0,36	CLO, SUT
Sururu processado	1	AMP, CFL, CAZ	0,27	CAZ
	3	AMP	-	-
	1	CLO	-	-

AMP (Ampicilina); CFL (Cefalotina); CAZ (Ceftazidima); SUT (Sulfazotrin), CLO (Cloranfenicol); Índice MAR (Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana); Nº (número de cepas).

Noorlis et al. (2011) relataram índice MAR de 0,93 em cepas de *V. parahaemolyticus* isolados em amostras de peixes na Malásia. Damarola et al. (2009) também relataram elevados valores de índice MAR (0,63) em cepas de *V. parahaemolyticus* provenientes em amostras ambientais na Inglaterra.

A resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos pode ser atribuída a características inerentes as células, sendo geralmente determinada por genes cromossômicos. No entanto, algumas estirpes podem sofrer mutações, receber plasmídeos ou transposons e ao adquirirem a resistência repassa-la às futuras linhagens (COSTA et al., 2008).

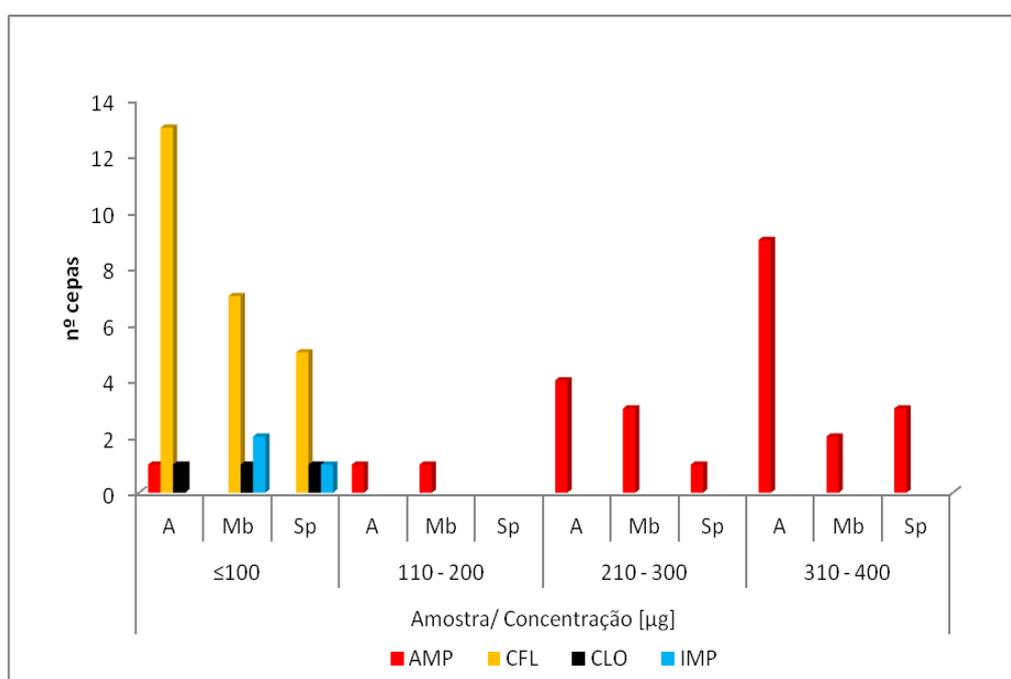
Resistência mediada por plasmídeos foi observada em 25%, 20% e 12%, das cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas dos bivalves *in natura*, sururu processado e água, respectivamente, principalmente para a cefalotina, cloranfenicol e ceftazidima (Tabela 5).

Os plasmídeos presentes nas estirpes apresentaram peso molecular variando de 3,0 a 5,0 kb, tendo em algumas cepas a presença de até dois

plasmídeos (1,5 e 3,0 kb). Lajnef et al. (2011) também observaram a presença de um ou mais plasmídeos variando de 0,5 a 45 kb em cepas de *Vibrio alginolyticus*.

Manjusha e Sarita (2013) analisando frutos do mar em Kerala, Índia, relataram que a frequência de plasmídeos em moluscos foi de 40% e em crustáceos de 20%, com o peso molecular variando de 5,98 kb a 19,36 kb. De acordo com os autores, a maioria das estirpes não apresentaram plasmídeos e a elevada resistência observada era mediada por cromossomos.

*Vibrio parahaemolyticus* apresentou uma CIM variando de 20 a >400 µg (Figura 1). Para a ampicilina os isolados apresentaram uma CIM máxima de >400 µg (47%), ou seja, 40x a concentração do antimicrobiano presente no disco teste, enquanto para a cefalotina a CIM ( $\leq 100$  µg) foi 3x a concentração do disco. Para o imipinem os isolados apresentaram a menor CIM (20 µg) (Figura 1).



**Figura 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de água (A), moluscos bivalves in natura (Mb) e sururu processado (Sp) no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Zanetti et al. (2001) relataram que 88,9% dos isolados em ambientes marinhos foram resistentes à ampicilina (CIM > 64 mg) devido à produção de  $\beta$ -lactamases.

### 3.2. Presença de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls)

A presença de M $\beta$ Ls foi observada nas cepas resistentes ao imipenem (carbapenema), ampicilina (penicilina), cefalotina e ceftazidima (cefalosporina). Enzimas M $\beta$ Ls foram produzidas em 100% dos isolados de *V. parahaemolyticus* (imipenem e ceftazidima) frente aos dois agentes quelantes usados (Tabela 6).

Este fato é preocupante por se tratar de antimicrobianos de 4<sup>a</sup> geração (imipenem) e 3<sup>a</sup> geração (ceftadizima) de amplo espectro de ação e uso controlado. De acordo com Picoli et al. (2008) os carbapenemas têm sido uma classe de uso reservado para o tratamento de infecções severas causadas por organismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas de última geração.

**Tabela 6.** Percentual da presença de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) em *Vibrio parahaemolyticus* isolados em água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Amostra	Imipenem/ceftazidima			Ampicilina/cefalotina		
	n <sup>o</sup> (%)			n <sup>o</sup> (%)		
	MPA/EDTA	MPA	EDTA	MPA/EDTA	MPA	EDTA
Água	01 (100)	-	-	12 (71)	-	05 (29)
Molusco bivalve <i>in natura</i>	01 (100)	-	-	04 (50)	-	04 (50)
Sururu processado	-	-	-	02 (40)	-	03 (60)

Quando testados os agentes quelantes frente aos antimicrobianos ampicilina e cefalotina, a produção de M $\beta$ Ls foi menor, ao redor de 60%. A eficiência dos agentes quelantes combinados foi melhor para o imipenem (EDTA/MPA) do que para a ampicilina (Tabela 6). O uso de apenas um agente quelante (EDTA) apresentou melhor eficiência. Figueredo et al. (2009) estudando estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* também relataram que a utilização dos agentes quelantes EDTA/MPA foi o método mais eficiente para a detecção de M $\beta$ Ls.

Nos últimos anos genes de M $\beta$ Ls têm sido difundido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* para as Enterobacteriaceae, agravando o cenário clínico, visto que as M $\beta$ Ls hidrolisam praticamente todas as classes de  $\beta$ -

lactâmicos (WALSH et al., 2002), não havendo dados quanto à presença de MβLs em *Vibrio*.

Segundo Figueiredo et al. (2009) a ampla distribuição de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* na natureza, permite que estes micro-organismos possam realizar transferência horizontal de genes de resistência antimicrobiana para os vibrios, devido a rápida difusão dos genes inter e intra-espécies (PICOLI, 2008).

De acordo com o *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY) tem-se observado um aumento mundial da ocorrência de MβLs, principalmente na Ásia, Europa e América Latina (PICOLI, 2008). Na Coreia, aproximadamente 10 a 50% da resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. se deve a produção de MβLs, podendo se espalhar rapidamente para várias espécies de bacilos Gram-negativos (YONG et al, 2002).

A primeira verona imipenemase (VIM-2) diagnosticada na América do Sul ocorreu em 2002 em pacientes de hospitais do Chile e Venezuela. Em 2004, um surto generalizado de *P. aeruginosa* multiresistente contendo VIM-8 foi descrito em um hospital em Cali, Colômbia, associada a contaminação ambiental (VILLEGAS et al., 2006). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de amostras em *P. aeruginosa* produtoras de MβLs também ocorreu em 2002, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ) (FIGUEREDO et al., 2009).

### **3.3. Fatores de virulência fenotípicos**

A patogênese das infecções por vibrios é complexa e relacionada a uma variedade de fatores de virulência (MASINI et al., 2007), dentre eles a atividade enzimática e hemolítica.

O padrão de recorrência de exoenzimas e atividade hemolítica para as cepas de *V. parahaemolyticus* foram a amilase > DNase > fosfolipase > hemolisina > gelatinase > lipase > caseinase > urease. Todas as cepas apresentaram positividade a pelo menos um fator fenotípico de virulência testado, tendo alguns isolados apresentado positividade a até cinco testes. Estes resultados são corroborados por Costa et al. (2013) que detectaram vários perfis enzimáticos para estirpes de vibrios (DNase > amilase > gelatinase > lipase > fosfolipase > caseinase).

Do total de *V. parahaemolyticus* nos diferentes substratos, o maior percentual de positividade foi para amilase (97%), seguido pela DNase (83%), fosfolipase (70%), atividade  $\beta$ -hemolítica (57%), gelatinase (43%), lipase (13%) e caseinase (7%). Não foi observado atividade da enzima urease (Tabela 7).

**Tabela 7.** Perfil de virulência fenotípico em cepas de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de água, moluscos bivalves *in natura* e processado no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil, durante o período de setembro/2010 a fevereiro/2012.

Exoenzima	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> %			Percentual
	A (17)	Mb (8)	Sp (5)	Total
Lipase	12	25	0	13
Fosfolipase	82	37	80	70
Gelatinase	41	62	20	43
Caseínase	0	0	20	7
DNase	13	100	80	83
Amilase	100	100	80	97
Urease	0	0	0	0
$\beta$ -Hemolise	53	50	80	57

A (Água); Mb (Molusco bivalve); Sp (Sururu processado).

As exoenzimas estão relacionadas a casos de bacteremia em seres humanos, capacidade de hidrolisar o colágeno (gelatinase), toxicidade bacteriana (caseinase), degradação de lipídios de membrana (lipase), capacidade de atuar como hemolisina (fosfolipases) (COSTA et al., 2013), bem como atuarem catalisando a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA (MARQUES et al., 2013). A presença destas exoenzimas em micro-organismos isolados de água e alimentos é um risco as comunidades que utilizam o estuário para o lazer ou extração de alimento, visto que aumentam a capacidade de infecção do micro-organismo.

Masini et al. (2007) avaliando cepas de vibrios em amostras de água em um balneário na Itália, observaram um percentual elevado de positividade para a gelatinase (86%), lipase (54%), protease (14%), urease (7%) e atividade hemolítica (3%). Costa et al. (2013) determinando o perfil de virulências em cepas de *V. parahaemolyticus* isolados em ostras frescas e congeladas detectaram 100% de atividade para a DNase positivas e amilase (97,5%).

Para Cabrera-Rodríguez et al. (2008) a produção de proteases, lipases, citotoxinas, entre outros, são comuns ao gênero *Vibrio*, estando envolvidas em quadros de edema hemorrágico e comprometimento do sistema de defesa do organismo, favorecendo o desenvolvimento de processos infecciosos.

O fenômeno de kanagawa ( $\beta$ -hemólise) foi relatado em 57% das cepas de *V. parahaemolyticus*, mostrando que os isolados são capazes de induzir a reação de hemólise dos eritrócitos humanos. A veiculação de cepas de *V. parahaemolyticus* kanagawa-positiva em ostras é um problema de saúde pública, principalmente quando ingeridas cruas ou mal cozidas. Segundo Pereira et al. (2004) estirpes de *V. parahaemolyticus* Kanagawa-negativo também têm sido responsáveis por infecção gastroentérica em humanos.

O consumo de frutos do mar crus ou parcialmente aquecidos, quando contaminados com *V. parahaemolyticus* pode levar a gastroenterite aguda. Em muitos países da Ásia e Japão esta bactéria é reconhecida como a principal causa de DVAs, em virtude do elevado consumo de pescado (YANG et al., 2008). Na China o teste de  $\beta$ -hemolísina é amplamente utilizado de forma rotineira para a detecção de cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* (HONGPING et al., 2011).

Segundo Vongxay et al. (2008) em amostras ambientais a presença de cepas Kanagawa-positivo tem sido verificado em apenas 1 a 3% dos isolados, enquanto em estirpes de origem clínica, o percentual de detecção é de 90%.

A capacidade de hidrólise da ureia não foi observada nos isolados de *V. parahaemolyticus*, bem como a presença do gene *trh*. Segundo Nair et al. (2007), a hidrólise da uréia está diretamente associado a presença do gene *trh*. Estes dados são corroborados com os achados de Lozano-León (2003), que ao analisarem *V. parahaemolyticus* isolados a partir de surtos associados ao consumo de ostras na Espanha, também verificaram a ausência de urease e genes *trh*.

Os genes *tdh* e *trh* associados à virulência em *V. parahaemolyticus* não foram detectados. De acordo com a literatura a maioria dos isolados ambientais não são toxigênicos (WALSH et al., 2002).

Vongxay et al. (2008) caracterizando a patogenicidade de *V. parahaemolyticus* em amostras clínicas e ambientais relataram que em 191 isolados provenientes de frutos do mar, apenas 02% dos isolados apresentavam

o gene *tdh* e 04% o gene *trh*. Segundo os autores apenas duas cepas apresentaram ambos os genes.

Chang et al. (2011) analisando amostras de água, ostras e sedimento no sul de Taiwan relataram que 86% dos isolados apresentavam o gene *tdh* e 34% o gene *trh*.

Não foi encontrada uma relação entre a presença do gene *tdh* e a positividade para o fenômeno de Kanagawa (Tabela 7) nos isolados de *V. parahaemolyticus*, visto que isolados bacterianos que não possuem o gene *tdh* podem expressar essa característica em virtude de outros fatores de virulência.

Hongping et al. (2011) em seu estudo com isolados de origem ambiental e clínicas relataram que o gene *tdh* se mostrou mais específico que o teste de Kanagawa na identificação de cepas patogênicas, além de não ter sido observado uma correlação entre o gene *tdh* e a positividade do teste de Kanagawa.

Estudos têm mostrado que independentemente da produção da hemolisina termoestável direta (*tdh*), a bactéria altera a barreira epitelial do hospedeiro por induzir rearranjos do citoesqueleto, resposta pró-inflamatória e/ou morte celular, devido ao envolvimento de outros fatores de virulência (NAIR et al., 2007).

Os mecanismos de patogenicidade em *V. parahaemolyticus* têm sido amplamente investigados (SANTOS et al., 2013), visto que um monitoramento de cepas patogênicas em frutos do mar é importante para fins econômicos e da saúde humana (CARIANI et al., 2012).

#### **4. Conclusão**

A elevada resistência microbiana e a produção de MβLs em *V. parahaemolyticus* no estuário de São Francisco do Conde, Bahia, demonstra que o ambiente vem sofrendo com o lançamento de antimicrobianos ou microorganismos resistentes, afetando a microbiota residente. Apesar da ausência de genes de virulência *tdh* e *trh* a elevada produção de exoenzimas pode promover a invasão e lesão dos tecidos do hospedeiro, não descartando o potencial toxigênico. Assim, o consumo de moluscos bivalves na região pode ser veículo de surtos alimentares, principalmente quando ingeridos crus.

## 5. Agradecimentos

A FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho. A equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da UFRB pela ajuda e apoio constante. A equipe do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR da Universidade Federal do Ceará, em especial Francisca Gleire Menezes, Cristiane Teles e Daniel Rodrigues.

## 6. Referências

ARAÚJO, M.R.E.; AQUINO, C.; SEARAMAL, E.; CIOLA, C.S.; SCHETTINO, G., & MACHADO, M.C.C. (2007) *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11, 302-305.

AUSTIN, A., AUSTIN, D., SUTHERLAND, R., THOMPSON, F., & SWINGS, J. (2005) Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology*, 7, 1488-1495.

AUSTIN, B. (2010) *Vibrios* as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140, 310-317.

BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L., & CANTÓN, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 260-265.

BEJ, A. K., PATTERSON, D. P., BASHER, C. W., VICKERY, M. C. L., JONES, D. D., & KAYSNER, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 215-225.

BERQUÓ, L. S., BARROS A. J. D., LIMA, R. C., & BERTOLDI, A. D. (2004). Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. *Revista de Saúde Pública*, 38, 239-246.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2013). Increase in *Vibrio parahaemolyticus* illnesses associated with consumption of shellfish from several Atlantic coast harvest areas, United States. Base de dados: <http://www.cdc.gov/vibrio/investigations/vibriop-09-13/map.html>.

CABRERA-RODRÍGUEZ, L.E., BRAVO-FARIÑAS, L., RAMÍREZ-ÁLVAREZ, M.M., LLOP-HERNÁNDEZ, A., FERNÁNDEZ-ABREU, A., MORIER, L., & BORREGO-HERNÁNDEZ, G. (2008) Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Revista Biomédica*, 19, 138-144.

CARINAI, A., PIANO, A., CONSOLANDI, C., SEVERGNINI, M., CASTIGLIONI, B., CAREDDA, G., CANDELA, M., SERRATORE, P. BELLIS, G., & TINTI, F. (2012). Detection and characterization of pathogenic vibrios in shellfish by a ligation detection Reaction-Universal Array approach. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 474-482.

CHANG, H.-C., CHEN, M.-L., SU, Y.-C., PAI J.-Y., & CHIU, T.-H. (2011) Molecular characterizations of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Southern Taiwan oyster-growing environment. *Food Control*, 22, 245-251.

CORDEIRO, D., LOPES, T. G. G., OETTERER, M., PORTO, E., & GALVÃO, J. (2007). A Qualidade do mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 25, 165-179.

COLLIN, B., & REHNSTAM-HOLM, A-S. (2011). Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden. *FEMS Microbiology Ecology*, 78, 306-313.

COSTA, R. A., HITZSCHKY, G, VIEIRA, F., SILVA, G. C., VIEIRA, R. H. S. F., & SAMPAIO, S. S. (2008) Susceptibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação

destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará-Nota prévia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45, 458-462.

COSTA, R. A., SILVA, G. C., PEIXOTO, J. R. O., VIEIRA, G. H. F., & VIEIRA, R. H. S. F. (2010). Quantification and distribution of *Vibrio* species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58, 183-188.

COSTA, R. A., AMORIM, L. M. M. C., ARAÚJO, R. L., & VIEIRA, R. L., R. H. S. dos F. (2013) Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters. *Revista Argentina de Microbiología*, 45, 267-270.

COSTA-SOBRINHO, P. DE S., DESTRO, M. T., FRANCO, B. D. G. M., & LANDGRAF, M. (2011). Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. *Food Microbiology*, 28, 137-140.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (2003) Approved Standard- 6<sup>o</sup> Edition. NCCLS document M7-A6.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; approved Guideline* (2010). M49-A, 26, 50.

DARAMOLA, B. A., WILLIAMS, R., & DIXON, R. A. (2009) In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in northern England. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 490-503.

DSMZ. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Vibrio* (2013). Base de dados: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>.

ESPIÑEIRA, M, ATANASSOVA, M., VIEITES, J.M., & SANTA CLARA, F.J. (2010) Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and

virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27, 122-131.

FAO/WHO. (2001) *Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, "Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of Campylobacter spp. in broiler chickens and Vibrio spp. in seafood", Ad hoc expert consultations on risk assessment of microbiological hazards in foods, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 23-27.*

FIGUEIREDO, D. Q. de, CASTRO, L. F. S., SANTOS, K. R. N., TEIXEIRA, L. M., & MONDINO, S. S. B. (2009) Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45, 177-184.

FONTOURA, M., ARAUJO, T., & SANCHES, L. (2009) Caracterização geral do município de São Francisco do Conde. São Francisco do Conde: Prefeitura Municipal de São Francisco do Conde. 22p. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/22932852/135843512/name/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o+de+S%C3%A3o+Francisco+do+Conde+atualizado+08+out+2009.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2014.

HAN, F., WALKER, R. D., JANES, M.E., PRINYAWIWATKUL, W., & GE, B.(2007) Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7096-7098.

HONGPING, W., JILUN, Z., TING, J., YIXI, B., & XIAOMING, Z. (2011) Insufficiency of the kanagawa hemolytic test for detecting pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69, 7-11.

IKEDA, Y., MAMIYA, T., NISHIYAMA, H., NARUSAWA, S., KOSEKI, T., MOURI, A., & NABESHIMA, T. (2012) A permission system for carbapenem use reduced

incidence of drug-resistant bacteria and cost of antimicrobials at a general hospital in Japan. *Nagoya. Journal of Medical Science*, 74, 104.

KANUNGO, S., SUR, D., ALI, M., YOU, Y.A., PAL, D., MANNA, B., NIYOGI, S.K., SARKAR, B., BHATTACHARYA, S.K., CLEMENS, J.D., & NAIR, G. B. (2012). Clinical, epidemiological, and spatial characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea and cholera in the urban slums of Kolkata, India. *BMC Public Health*, 12, 830.

LAJNEF, R., SNOUSSI, M., ROMALDE, J. L., NOZHA, C., & HASSEN, A. (2012). Comparative study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from four Tunisian marine biotopes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 3345-3363.

LESLEY, M. B., VELNETTI, L., CHEAH, Y. K., SON, R., KASING, A., SAMUEL, L., MICKY, V., & NISHIBUCHI, M. (2011). Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. *International Food Research Journal*, 18, 1183-1188.

LOZANO-LEÓN, A., TORRES, J., OSORIO, C.R., & MARTÍNEZ-URTAZA, J. (2003) Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 226, 281-284.

MASINI, L., GRANDIS, G. de, PRINCIPI, F., MENGARELLI, C., & OTTAVIANI, D. (2007). Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). *Water Research*, 41, 4031-4040.

MANJUSHA, S., & SARITA, G. B. (2013). Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. *International Food Research Journal*, 20, 77-86.

MARQUES, V.F., SOUZA, M.M.S., MENDONÇA, E.C.L., ALENCAR, T.A., PRIBUL, B.R., COELHO, S.M.O., LASAGNO, M., & REINOSO, E.B. (2013) Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33, 161-170.

MOLINA-AJA, A., GARCÍA-GASCA, A., ABREU-GROBOIS, A., BOLÁN-MEJÍA, C. ROQUE, A., & GOMEZ-GIL, B., (2002). Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, 213, 7-12.

NAIR, G. B., RAMAMURTHY, T., BHATTACHARYA, S.K., DUTTA, B., TAKEDA, Y., & SACK, D. A., (2007). Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 39-48.

NOGUEROLA, I., & BLANCH, A. R. (2008). Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*. 105, 175-185.

NOORLIS, A., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., TUAN ZAINAZOR, T. C., WONG, W. C., TUNUNG, R., PUI, C. F., NISHIBUCHI, M., NAKAGUCHI, Y., & SON, R. (2011). Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. *International Food Research Journal*, 18, 1523-1530.

OLGUNOGLU, İ. A. (2012). *Salmonella in Fish and Fishery Products, Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathoge*. Base de dados: Available from:<http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/salmonella-in-fish-andfishery-products>. 91-105.

OLIVEIRA, J.F.P., CIPULLO, J.P., & BURDMANN, E.A. (2006) Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 21, 444-452.

PARVEEN, S., HETTIARACHCHI, K. A., BOWERS, J. C., JONES, J. L. J., TAMPLIN, M.L., MCKAY, R., BEATTY, W., BROHAWN, K., DASILVA, L. L., & DEPAOLA, A. (2008) Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 354-361.

PEREIRA, C.S., VIANA, C.M., & RODRIGUES, D.P. (2004) *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 24, 591-595.

PEREIRA, C.S., POSSAS, C.A., VIANA, C.M., & RODRIGUES, D.P. (2007) Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 56-59.

PICOLI, S. U. (2008). Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. *RBAC*. 40, 273-277.

PONTES, D. S., PINHEIRO, F. A., LIMA-BITTENCOURT, C. I., GUEDES, R. L. M., CURSINO, L., BARBOSA, F., SANTOS, F. R., CHARTONE-SOUZA, E., & NASCIMENTO, A. M. A. (2009). Multiple antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial Ecology*, 58, 762-772.

POLLOCK, F. J., MORRIS, P. J., WILLIS, B.L., & BOURNE, D.G. (2010). Detection and Quantification of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5282-5286.

RAISSY, M., MOUMENI, M., ANSARI, M., & RAHIMI, E. (2012). Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11, 618-626.

RAGHUNATH, P.; ACHARYA, S.; BHANUMATHI, A.; KARUNASAGAR., I., & KARUNASAGAR, I. (2008) Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. *Food Microbiology*, 25, 824-830.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., & MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANTOS, C. A. M. L., & VIEIRA, R. H. S. F. (2013) Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55, 219-228.

SANTOS, L. F. P. (2011) Avaliação dos teores de cádmio e chumbo em pescado proveniente de São Francisco do conde, Bahia. 75p (Dissertação), Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS, R. F. S. dos, & GOMES, R. A. R. (2011). *Manual de Métodos de análise microbiológica*. Ed. Varela. 4 ed. São Paulo. 552.

SOUSA, O. V. de, VIEIRA, R. H. S. dos F., MENEZES, F. G. R. de, REIS, C. M. F. dos, & HOFER, E. (2004). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46, 59-62.

SVS- Secretária de Vigilância Sanitária (2008). *Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera*, Editora MS, Brasília, 168.

VILLEGAS, M. V., LOLANS, K, OLIVEIRA, M. R., SUAREZ, C.J, CORREA, A., QUEENAN, A. M., & QUINN, J. P.(2006). First Detection of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 226–229.

VONGXAY, K., WANG, S., ZHANG, X., WU, B., HU, H., PAN, Z., CHEN, S., & FANG, W. (2008) Pathogenetic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 71-75.

WAGATSUMA, S. (1968) A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle*, 13, 159.

WALSH, T. R., BOLMSTROM, A., QWARNSTROM, A., & GALES, A. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo-  $\beta$  -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2755-59.

YANG, Z.-Q., JIAO, X. UM, ZHOU, X.-H., CAO, G. X., FANG, W.-M., & GU, R.-X. (2008) Isolamento e caracterização molecular de *Vibrio parahaemolyticus*, de baixa temperatura preservada, produtos do mar secos, salgados e frescos em duas áreas costeiras do leste da China. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 279-285.

YONG, D., LEE, K., YUM, J. H., SHIN, H. B., ROSSOLINI, G.M., & CHONG, Y (2002). Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-Producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3798-3801.

YOON, K.S., MIN, K. J., JUNG, Y. J., KWON, K. Y., LEE, J. K., & OH, S. W. (2008). A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology*, 25, 635-641.

ZANETTI, S., SPANU, T., DERIU, A., ROMANO, L., SECHI, L.A., & FADDA, G. (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 407-409.

---

## **CAPÍTULO 3**

**PERFIL DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E  
PATOGENICIDADE DE *Vibrio cholerae* EM AMOSTRAS  
AMBIENTAIS**

---

Este artigo será submetido à revista Food Microbiology.

## PERFIL DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E PATOGENICIDADE DE *Vibrio cholerae* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Irana Paim Silva<sup>1</sup>, Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>2</sup>, Oscarina Viana de Sousa<sup>3</sup>,  
Carla Silva da Silveira<sup>4</sup>, Camila de Sousa Carneiro<sup>4</sup>

<sup>1,4,5</sup>Mestranda em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB/Embrapa Mandioca e Fruticultura.

<sup>2</sup>Professora Adjunto - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

<sup>3</sup>Professora Adjunto - Universidade Federal do Ceará - UFC

Resumo: Este estudo objetivou caracterizar a resistência antimicrobiana e o perfil de patogenicidade de *Vibrio cholerae* isolado em amostras de água e moluscos bivalves. Para isso, foram utilizadas seis cepas de *V. cholerae* que se encontravam depositadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de alimentos e ambiental no NEPA/UFRB. Inicialmente, as cepas foram submetidas à identificação fenotípica e molecular usando os *primers* (*OmpW*). Para os testes de suscetibilidade microbiana foram usados 11 fármacos de sete classes, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e produção de enzimas metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls). Na caracterização de virulência foi usado o soro anti-*Vibrio cholerae* O1 e os iniciadores *ctxAB* (toxina da cólera), *tcp* (pelo corregulador da toxina), *rfbO1* (sorogrupo O1) e *zot* (toxina zonula occludens). As cepas de *V. cholerae* (03 de água e 03 de moluscos bivalves *in natura*) foram confirmadas na bioquímica e apresentaram o gene *OmpW*. *Vibrio cholerae* apresentou elevada sensibilidade aos antimicrobianos (92%). Resistência antimicrobiana foi verificada em apenas 33% dos isolados (água) ao imipenem (CIM 20  $\mu$ g), com produção de M $\beta$ Ls. Não foi observado perfil de multiresistência. Apesar do anti-soro indicar a presença de *Vibrio cholerae* sorogrupo O1 em 50% das cepas (67% de água e 33% de moluscos bivalves) não foi detectado o gene *rfbO1*. Não foi observada a presença de genes *ctx*, *tcp* e *zot*. As estirpes de *Vibrio cholerae* provenientes do estuário de São Francisco do Conde, Bahia apresentam elevada suscetibilidade antimicrobiana, não expressando toxigenicidade.

**Palavras chave:** Ostras, sururu, saúde pública, virulência.

## PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PATHOGENICITY OF *Vibrio cholerae* IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

Abstract: This study aimed to outline the antimicrobial resistance and pathogenicity profile of *Vibrio cholerae* isolated in samples of water and bivalve molluscs. In order to reach out this objective, six *V. cholerae* strains, which were all deposited in the culture collection of the Laboratory of Microbiology of Food and Environmental in NEPA / UFRB, were used. Initially, the strains were subjected to phenotypic and molecular identification using primers (*OmpW*). For microbial susceptibility testing 11 pharmacos of seven classes, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and production of metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) were used. In the characterization of virulence serum anti- *Vibrio cholerae* O1 and *ctxAB* primers (cholera toxin), *tcp* (by correolador toxin), *rfbO1* (serogroup O1) and *zot* (zonula occludens toxin) were used. The strains of *V. cholerae* (03 samples of water and 03 samples of fresh bivalve molluscs) were confirmed in biochemical and presented the *OmpW* gene. *Vibrio cholerae* showed high sensitivity to antimicrobial agents (92 %). Antimicrobial resistance was detected in only 33% of the isolates (water) to imipenem (MIC 20 mg), with M $\beta$ Ls production. No multidrug resistance profile was observed. Although the antiserum indicated the presence of serogroup O1 *Vibrio cholerae* in 50% of the strains (67% of water and 33% of bivalve molluscs) *rfbO1* gene was not detected. *Ctx* genes, *zot* and *tcp* presence were not observed. Strains of *Vibrio cholerae* from the estuary of São Francisco do Conde, Bahia exhibit high antimicrobial susceptibility, not expressing toxigenicity.

Keywords: Oysters, mussels, public health, virulence.

## 1. Introdução

*Vibrio cholerae* ocorre naturalmente em água doce e salobra em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo o agente causador da cólera (SANTOS & VIEIRA, 2013). A água é um dos principais veículos na transmissão da doença, sendo capaz de causar surtos de proporções endêmicas, epidêmicas e pandêmicas (GOEL et al., 2010).

A classificação do *V. cholerae* é baseada em sorogrupos ou sorovares que tem como base os seus antígenos somáticos (antígenos O) e até o momento identificados 206. Os sorogrupos O1 e O139 toxigênicos têm sido diretamente associados à cólera epidêmica (O1 e O139) e pandêmica (O1) (RAYCHOUDHURI et al., 2009). *Vibrio cholerae* O1 pode ser classificado em dois biótipos, Clássico e El Tor. Fatores antigênicos permitem a diferenciação desses biótipos em três sorotipos, Ogawa, Inaba e Hikojima, este último raro (RISTORI et al., 2006).

A patogênese da cólera é um processo complexo que envolve ações sinérgicas de vários genes, dentre eles: *ompW* (proteína de membrana externa), *ctx* (toxina colérica), *tcp* (corregulador da toxina pilus), *zot* (toxina zonula occludens) e *rfbO1* (antígeno somático) (GOEL et al., 2007).

A maioria das cepas ambientais é classificada como não-O1 e não-O139. Embora algumas estirpes de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 tenham sido capazes de causarem gastroenterites ou infecções extra-intestinais em humanos, o seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido (ULLOA et al., 2011).

O uso extensivo e abusivo de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, agricultura e aquicultura, bem como o descarte inadequado de antimicrobianos têm causado o aumento de bactérias resistentes (CRESTANA & SILVA, 2011; MANJUSHA & SARITA, 2013). A resistência microbiana envolve cada vez mais espécies bacterianas e novos mecanismos de resistência (DÍAZ et al., 2006), além de interferir no tratamento efetivo das infecções por estes agentes (BACCARO et al., 2002).

O estudo da resistência antimicrobiana em micro-organismos indígenas da água é importante, uma vez que pode indicar o grau de alteração dos ecossistemas pela ação humana, além de servirem de reservatórios para genes de resistência (VASCONCELOS et al., 2010).

Os  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana. A produção de  $\beta$ -lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas a esses agentes (MACEDO et al., 2005). As metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) são enzimas que apresentam um largo espectro de atividade, sendo codificadas por genes plasmidiais e ocorrendo em bactérias específicas como *Pseudomonas aeruginosas* e *Acinetobacter ssp.* (PICOLI, 2008).

O município de São Francisco do Conde responde por 40% do abastecimento de água da região metropolitana de Salvador e considerado uma área de proteção ambiental (SANTOS, 2011). Entretanto, a degradação do ambiente na região contribui para a poluição das águas, solo e ar (FONTOURA et al., 2009). A presença de comunidades ribeirinhas no estuário vivendo em condições precárias, bem como a extensa atividade de mariscagem na região faz-se necessário um monitoramento da qualidade microbiológica do ambiente. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de *Vibrio cholerae*, quanto à resistência antimicrobiana frente aos fármacos comerciais e o seu perfil de virulência.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Isolamento e identificação**

Foram utilizadas seis cepas de *V. cholerae* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves *in natura* (ostras e sururu) provenientes do estuário em São Francisco do Conde, Bahia. Os isolados pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA, na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. As estirpes se encontravam armazenadas em agar estoque e mantidas a 15°C.

Inicialmente, os isolados passaram por um processo de re-isolamento e identificação bioquímica. Estes foram previamente crescidos em caldo infusão cérebro e coração (BHI) contendo 1% de NaCl (pH 8,5) a 37°C por 24 horas e posteriormente inoculadas em placas de petri contendo agar tiosulfato citrato bile e sacarose (TCBS). Para a identificação bioquímica foi utilizada a chave de identificação de Noguera e Blanch (2008) e identificação molecular por meio dos

primers *ompW* com os iniciadores F: 5' – CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG- 3' e R:5' – GGT TTG TCG AAT TAG CTT CAC C - 3' (GOEL et al., 2007).

## 2.2. Análise sorológica

As cepas de *Vibrio cholerae* foram submetidas à caracterização antigênica para identificação do sorotipo, utilizando o soro polivalente anti-*V. cholerae* O1 (Probac®). De acordo com o fabricante a aglutinação deve ocorrer dentro de dois minutos para todas as variedades de *V. cholerae* O1 (Inaba, Ogawa, Hikojima). Essa prova foi realizada em placa de vidro e observada a aglutinação das cepas.

## 2.3. Perfil de virulência

Para a detecção dos genes de virulência o DNA total extraído foi amplificado pela técnica Multiplex-PCR. Os iniciadores específicos usados para *V. cholerae* são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados na análise molecular para a detecção da patogenicidade em *Vibrio cholerae*.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Amplicons (pb)	Fonte
<i>ctxAB</i>	F:5' –GCC GGG TTG TGG GAA TGC TCC AAG - 3' R:5' – GCC ATA CTA ATT GCG GCA ATC GCA TG - 3'	536	Goel et al. (2007)
<i>tcp</i>	F:5' – CGT TGG CGG TCA GTC TTG- 3' R:5' – CGG GCT TTC TTC TTG TTC G - 3'	805	
<i>rfbO1</i>	F:5' – TCT ATG TGC TGC GAT TGG TG - 3' R:5' – CCC CGA AAA CCT AAT GTG AG - 3';	638	
<i>zot</i>	F:5'- TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T - 3' R:5'– AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A - 3'	947	

*ctxAB* (toxina colérica); *tcp* (Co-regulador da toxina pilus); *rfbO1* (Gene de identificação do sorogrupo O1); *zot* (Toxina zonula ocludens); pb (Par de base).

## 2.4. Extração de DNA total

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo de extração de Sambrook et al. (1989) com modificações. Inicialmente, as cepas foram cultivadas em Caldo Tripton Soja (TSB) a 1% de NaCl e pH 8,5 por 24 h. Posteriormente 2 mL da cultura foram transferidos para tubos de *ependorf* e congeladas. Após 30 minutos de congelamento o material foi descongelado e

centrifugado (5.000 rpm/10min.), descartado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada estéril e novamente centrifugado.

O *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de tampão de extração adicionado de lisozima (0,15 M NaCl, 50 Mm Tris-HCL, 10 mM EDTA, 2% SDS, pH 8,0) e incubado por 1 h a 65°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 e 0,5 mL de acetato de potássio 0,5 M e centrifugado (10.000 rpm/15min.). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de *ependorf* onde o DNA foi precipitado com 1 volume de álcool isopropílico gelado e centrifugado (10.000 rpm/15min.). O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 80% gelado, centrifugado e seco *over night*. O DNA foi resuspensão em 0,1 mL de TE (10 Mm Tris-HCL; 1 Mm e EDTA) e estocado a -20°C.

## 2.5. Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a confirmação da espécie de *V. cholerae* e detecção de fatores genotípicos de virulência, o DNA total extraído foi amplificado pela técnica PCR e Multiplex-PCR usando os iniciadores específicos conforme Tabela 1. A especificidade da PCR multiplex foi determinada usando uma cepa padrão de *V. cholerae* (ATCC 19782) cedida pelo Instituto de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará. O ensaio do PCR foi realizado pela adição do DNA alvo a uma mistura reacional de 25 µL (Tabela 2) (GOEL et al., 2007).

**Tabela 2.** Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de *Vibrio cholerae*.

Reagentes da Reação	PCR	PCR- Multiplex
	<i>ompW</i>	<i>Ctx A e B, RfbO1, tcp, zot</i>
Tampão	5 µL	5 µL
dNTP's	0,5 µL	0,5 µL
Iniciador F	1,0 µL	1,0 µL*
Iniciador R	1,0 µL	1,0 µL*
MgCl <sub>2</sub>	1,0 µL	1,0 µL
Taq polimerase	0,2 µL	0,2 µL
H <sub>2</sub> O	6,15 µL	6,2 µL
DNA total	4 µL	4 µL
Volume da reação	25 µL	25 µL

Valor para cada *primer* utilizado.

Os produtos da extração de DNA e do PCR foram submetidos ao método de eletroforese em gel de agarose 1,5% com adição de *Gel red* para visualização dos produtos amplificados em transluminador. As corridas ocorreram com voltagem de 150V, amperagem de 400mA, e duração de aproximadamente 60 minutos. Os géis foram documentados em sistema de foto documentação digital Kodak EDAS290.

## **2.6. Suscetibilidade antimicrobiana**

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão de disco em placas, seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

Para o antibiograma, as colônias de *V. cholerae* foram repicadas em meio Triptona Soja Agar (TSA) inclinado e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alçada da cultura foi resuspensa em 9 mL de salina 0,85% até que a densidade bacteriana lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 ( $10^8$  UFC/mL) (CLSI, 2010). Após o ajuste, o inóculo foi espalhado no meio ágar Mueller-Hinton e adicionado os discos de antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e posteriormente seus halos de inibição medidos usando paquímetro digital. Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), cefalotina, ceftazidime (30 µg), ciprofloxacina, cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), nitofurantoína (300 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg). Para controle foi utilizado uma cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para o cálculo do índice de múltipla resistência antimicrobiana (índice MAR) foi usado à razão do número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de antimicrobianos testados, multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentual (HIRSCH et al., 2006). As estirpes que apresentaram resistência aos antimicrobianos determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), em intervalos de 10 em 10, iniciando na concentração imediatamente superior a do disco comercial (CLSI, 2003).

## 2.7. Resistência mediada por plasmídios-R

A presença ou ausência de plasmídios-R foi testada para as cepas que apresentaram perfil de multirresistência. Como agente de cura foi utilizado o Alaranjado de Acridine (AA) na concentração de 100 µg/mL. Após crescimento em caldo nutriente a 37°C por 24 h, alíquotas de 200 µL foram adicionadas aos tubos contendo caldo Luria Bertani (LB) (controle) e caldo LB + AA e incubados a 37°C por 24 h. Após essa etapa, as culturas foram submetidas novamente ao antibiograma (MOLINA-AJA et al., 2002).

As cepas que apresentaram perfil de resistência plasmidial foi realizada a extração do DNA plasmidial usando Kit “Plasmid Mini Kit I” (Omega/Bio-Tek®). O produto da extração foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8% com *gel red* para visualização em transiluminador com luz ultravioleta. Os géis foram documentados em sistema de foto documentação digital L-pix (Locus Biotecnologia).

## 2.8. Produção de metalo-β-lactamases (MβLs)

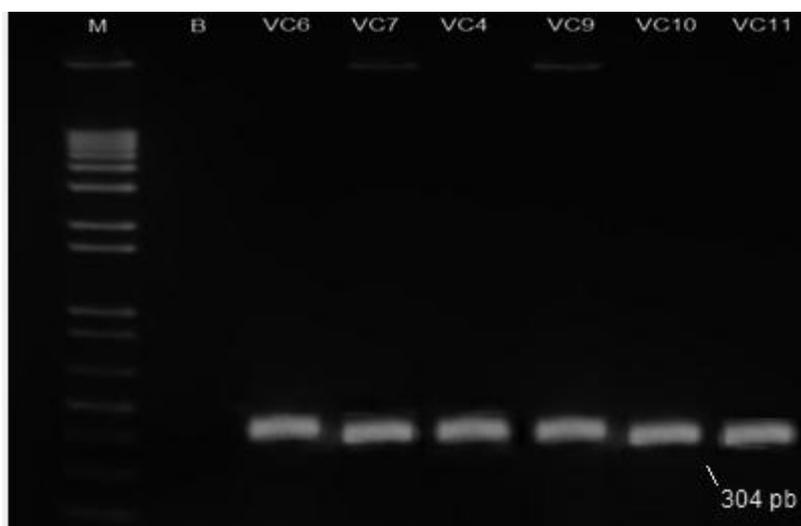
As culturas resistentes ao imipenem foram submetidas à avaliação da produção da enzima MβLs por meio do método de disco-aproximação de acordo com os protocolos propostos por Figueiredo et al. (2009) com modificações.

Após a padronização do inóculo ( $10^8$  UFC/mL) a suspensão foi semeada usando *swab* estéril em 17 mL de agar Mueller-Hinton. Em seguida, discos contendo imipenem (10 µg), ceftazidima (30 µg) e discos impregnados com 3 µl de uma solução de ácido 2-mercaptopropionico (MPA) (1,2 g/ml) e 10 µl de uma solução 0,5 M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (pH 8) foram posicionados na placa. As distâncias (centro a centro) entre os discos de antimicrobianos e os discos que receberam os agentes quelantes foram de 1,5 cm (disco contendo EDTA) e de 2 cm (disco contendo MPA). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. A observação de um halo ou do aumento do tamanho do halo ao redor dos discos de imipenem e/ou ceftazidima localizados próximos ao disco de MPA e/ou EDTA indicava a positividade do teste.

## 3. Resultados e Discussão

Do total de cepas testadas todas apresentaram anelamento na região do gene *ompW*, sendo três de amostras de água e três de moluscos bivalves (Figura

1). Goel et al. (2007) analisando um total de 56 amostras de água potável, relataram o gene *ompW* em apenas 12 amostras. Segundo os autores o gene *ompW* é específico e altamente conservado entre as estirpes de *V. cholerae* pertencentes a diferentes sorotipos e biótipos.



**Figura 1.** Perfil eletroforético da reação em cadeia da polimerase (PCR) das cepas de *Vibrio cholerae* com os primers *OmpW* (304 pb). M (Marcador) e B (Branco).

A presença de *V. cholerae* representa um risco à população que reside às margens do estuário, por utilizarem as águas para atividades de lazer, bem como a extração de moluscos bivalves para a alimentação e comercialização.

Globalmente, a cólera é a doença entérica de veiculação hídrica que mais tende a aumentar devido às mudanças climáticas e precárias condições higiênicossanitárias da população, servindo como um indicador social de desenvolvimento. Epidemias regionais estão associadas com períodos de chuvas excessivas, temperaturas altas e aumento nas populações de plâncton (MARKMAN, 2009).

No período de 1995 a 2006 em Angola, África, foram registrados apenas casos esporádicos de cólera, porém entre 2006 a 2008 verificou-se uma nova epidemia, sobretudo, nas regiões costeiras com um total de 84.000 casos e cerca de 3.150 mortos (MONTEIRO et al., 2013).

Nos Estados Unidos, Itália, Portugal e Austrália peixes e mariscos foram responsáveis tanto por epidemias como por casos isolados de cólera

(GONÇALVES et al., 2004). Em 2008, um dos maiores surtos de cólera ocorreu no Zimbábue, África, em que foram relatados nos primeiros cinco meses do surto, mais de 73.000 casos e 3.500 mortes (ISMAIL et al., 2013).

No Brasil, no período de 2002 a 2003 *V. cholerae* O1 foi isolado em amostras ambientais nos municípios de Alagoas e Pernambuco. Em 2004, a cólera ressurgiu no país, com a confirmação de 21 casos autóctones, enquanto em 2005, outros cinco casos foram registrados, todos procedentes do estado de Pernambuco (SVS, 2008). A falta de uma legislação que limite a presença de *V. cholerae* em pescado é um risco para a saúde pública, principalmente, quando se trata de moluscos bivalves, devido ao hábito cultural da região em consumir estes organismos *in natura*. A falta de dados epidemiológicos no país faz com que não se tenha dados reais do número de surtos envolvendo estes alimentos.

### 3.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

As estirpes de *V. cholerae* apresentaram suscetibilidade a 91% dos fármacos comumente usados pela população (Tabela 3). A elevada suscetibilidade do micro-organismo sugere tratar-se de uma contaminação recente, originária do carreamento de resíduos sólidos provenientes de comunidades que vivem às margens do rio Subaé ou seus afluentes, visto o micro-organismo ser sensível à elevada salinidade.

A suscetibilidade do *V. cholerae* ao grupo das penicilinas é satisfatória por se tratar de um dos fármacos usados no tratamento de DVAs (BERQUÓ et al., 2004), bem como a tetraciclina é a escolha no tratamento de infecções causadas por vibrios (HAN et al., 2007).

**Tabela 3.** Percentual de resistência das estirpes de *Vibrio cholerae* em amostras de água e moluscos bivalves no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde, Bahia, Brasil.

Antimicrobianos	<i>Vibrio cholerae</i> (6)					
	Água (3)			Mb (3)		
	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos						
- Gentamicina	100	0	0	100	0	0
β-lactâmicos						
- Ampicilina	100	0	0	100	0	0

- Cefalotina	100	0	0	100	0	0
- Ceftazidima	100	0	0	100	0	0
- Imipenem	67	0	33	100	0	0
<b>Fenicóis</b>						
- Cloranfenicol	100	0	0	100	0	0
<b>Nitrofurânicos</b>						
- Nitrofurântoína	100	0	0	100	0	0
<b>Quinolonas</b>						
- Ác. nalidíxico	100	0	0	100	0	0
- Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0
<b>Sulfonamidas</b>						
- Sulfazotrin	100	0	0	100	0	0
<b>Tetraciclinas</b>						
- Tetraciclina	100	0	0	100	0	0

A (Água); Mb (Molusco bivalve); S (Sensível); I (Intermediário); R (Resistente).

Os fármacos das classes das fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e aminoglicosídeos (gentamicina) são usados no tratamento de infecções causadas por *V. cholerae* O1 e O139 (OLIVEIRA et al., 2006; OKUDA et al., 2007).

Estes resultados são corroborados com os achados de Costa et al. (2008) ao relatarem cepas de *Vibrio* spp. isoladas em camarão e água de cultivo suscetíveis a gentamicina e ao cloranfenicol. Resultados contrários foram citados por Raissy et al. (2012) ao verificarem resistência à gentamicina de 83,3% e a tetraciclina de 18,1%.

Resistência antimicrobiana foi verificada apenas para o imipenem (33%) com uma CIM de 20 µg (isolado de água). Este fato sugere que ao longo do percurso do rio Subaé até a sua desembocadura, possa estar havendo o lançamento de efluentes hospitalares nas águas do rio, uma vez que este fármaco é de uso restrito as unidades hospitalares.

O imipenem é um fármaco de amplo espectro, utilizado no tratamento de infecções causadas por Enterobactériaceas produtoras de β-lactamases. O aparecimento de enzimas capazes de inativar as carbapenemas tem elevado a resistência microbiana, limitando as opções de tratamento (IKEDA et al., 2012).

A presença de *V. cholerae* resistente as carbapenemas é um risco para a propagação da resistência microbiana em bactérias ambientais, uma vez que o ambiente aquático é eficiente para a seleção de populações bacterianas

resistentes, devido à troca de genes de resistência por meio de elementos genéticos móveis (CARNEIRO et al., 2007)

Segundo Baquero et al. (2008) o estudo dessa resistência é relevante do ponto de vista da saúde pública, uma vez que indica o grau de extensão da alteração dos ecossistemas pela ação do homem, principalmente quando os antimicrobianos são liberados em esgotos pela urina e fezes.

As autoridades brasileiras no intuito de minimizar a problemática da resistência antimicrobiana no país limitaram o uso de antimicrobianos apenas com a prescrição médica (BRASIL, 2011). No entanto, falhas no tratamento em estações de esgoto, além do uso na profilaxia animal ainda têm contribuído para o lançamento de resíduos nos corpos hídricos.

No teste de cura verificou-se que a resistência ao imipinem foi mediada por plasmídeo. Entretanto, quando realizado a extração do DNA plasmidial, não foi verificada a presença deste. Análises do perfil plasmidial são mais efetivas quando os isolados possuem múltiplos plasmídios, visto que no momento da extração ou durante estocagem prolongada alguns plasmídeos podem ser perdidos (UENO & CARDOSO JORGE, 2001).

Manjusha & Sarita (2013) estudando cepas de *Vibrio* em frutos do mar em Kerala, Índia, relataram que a resistência por plasmídeos das cepas isoladas em moluscos foi de 40% e em crustáceos de 20%. De acordo com os autores, um grande número das estirpes não apresentaram plasmídeos, indicando resistência cromossômica.

### **3.2. Detecção de produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS)**

O isolado de *V. cholerae* que se mostrou resistente ao imipinem também produziu M $\beta$ LS. A disseminação de genes de M $\beta$ LS está associada à utilização de cefalosporinas de espectro estendido ou as carbapenemas (WALSH et al., 2002).

De acordo com a literatura não há relatos da presença de M $\beta$ LS em bactérias do gênero *Vibrio*, sendo estes voltados a bactérias oportunistas em infecções hospitalares. As M $\beta$ LS são amplamente estudadas nas espécies bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, entre outras (WALSH et al., 2002).

Na cidade de São Paulo, Brasil, espécies de *A. hydrophila* e *A. jandaei* isoladas em diferentes fontes de água, incluindo efluentes de tratamento de

esgoto, apresentaram atividade de M $\beta$ Ls de 87,8% e 10,9%, respectivamente (BALSALOBRE et al., 2009).

O gênero *Aeromonas* é um dos poucos micro-organismos que possuem diferentes genes cromossômicos ligados as  $\beta$ -lactamase (BALSALOBRE et al., 2009). A presença destes micro-organismos em ambientes aquáticos permite que informações genéticas sejam transferidas a outras espécies bacterianas, como os vibrios, uma vez que estes possuem um genoma dinâmico, conferindo características de resistência a importantes classes de fármacos (CARIANI et al., 2012).

Ambos os agentes quelantes (EDTA/MPA) apresentaram eficiência na inibição da enzima M $\beta$ Ls. Figueiredo et al. (2009) avaliando estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* relataram que a utilização desses agentes tem sido o método mais indicado na detecção da enzima.

Na Coreia, cerca de 10 a 50% da resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. está associada a presença de M $\beta$ Ls (YONG et al., 2002), Segundo estes autores, espécies de *P. aeruginosa*, *P. putida* e *A. baumannii* têm apresentado enzimas M $\beta$ Ls do tipo verona imipenemase-2 e imipenemase-1.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ Ls ocorreu em 2002, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ) (FIGUEIREDO et al., 2009).

### **3.3. Perfil de virulência**

#### **3.3.1 Análise sorológica**

O sorogrupo O1 foi confirmado em 50% das cepas de *V. cholerae*, sendo 67% proveniente das amostras de água e 33% de moluscos bivalves. A presença de *V. cholerae* O1 é preocupante, por se tratar de isolados em um ambiente que normalmente é utilizado para recreação e extração de moluscos bivalves, em virtude desse micro-organismo ser o agente causador da cólera epidêmica e capaz de causar surtos de grandes proporções (ISLAM et al., 2004).

Os sorogrupos O1 e O139 toxigênicos têm sido diretamente associados à cólera epidêmica ou pandêmica. Os demais sorogrupos possuem as mesmas

características morfológicas e bioquímicas do O1 e O139, aglutinando com seus próprios anti-soros não-O1 e não-O139 (RAYCHOUDHURI et al., 2009).

Gonçalves et al. (2004) avaliando a associação de *V. cholerae* com o zooplâncton no Maranhão, não relataram a presença de *V. cholerae* O1 e O139 a partir do TCBS, sendo obtidos apenas isolados de *V. cholerae* não-O1. De acordo com os autores, *V. cholerae* O1 foi melhor isolado pela imunofluorescência direta.

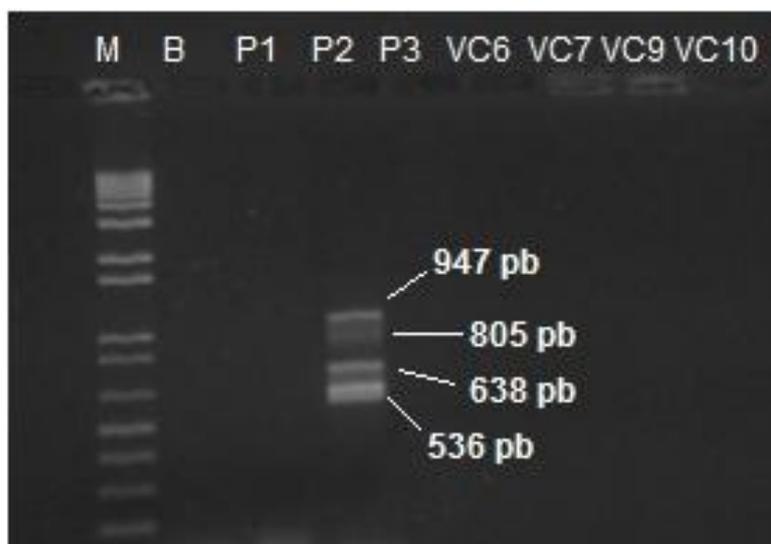
Apesar das demais estirpes serem de *Vibrio cholerae* não-O1 (50%), a sua presença não descarta a possibilidade de causarem gastroenterites, dado sua virulência estar associada a vários mecanismos. Sousa et al. (2004) também relataram preocupação com a presença de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 em 33,3% das amostras de ostras provenientes de criadouro natural em Fortaleza, Brasil, uma vez que as ostras comercializadas na região são consumidas *in natura* pela população.

Cabrera-Rodríguez et al. (2008) relataram *V. cholerae* não-O1 em casos esporádicos de gastroenterite aguda em diferentes países, mesmo as estirpes não produzindo a toxina colérica. Segundo os autores o mecanismo de patogenicidade foi devido à presença de uma enterotoxina termoestável.

Blokesch et al. (2007) também avaliando cepas de *V. cholerae* responsáveis por surto de cólera na Índia, enfatizaram a hipótese de transferência genética horizontal do sorogrupo O1 biótipo El Tor a O139 Bengal, resultando na substituição do gene por pressão ambiental.

### **3.3.2. Análise genética de virulência**

Não foi detectada a presença dos genes *ctxAB*, *tcp*, *rfbO1* e *zot* nos isolados de *V. cholerae* (Figura 2). Estes resultados são corroborados por Wong et al. (2012) ao relatarem *V. cholerae* isolados em amostras ambientais e não toxigênicos. No entanto, a produção de citotoxinas e enterotoxinas em isolados ambientais tem sido responsável pelo potencial de patogenicidade do micro-organismo (GONÇALVES et al, 2004).



**Figura 2.** Perfil eletroforético do PCR de *Vibrio cholerae* para virulência: *ctxAB* (536 pb), *tcp* (805 pb), *rfbO1* (638 pb) e *zot* (947 pb). M (Marcador); B (Branco) e Padrões de *Vibrio cholerae* (P1, P2 e P3).

A ausência dos genes *ctxA* e *zot* é semelhante ao estudo realizado com cepas ambientais de *V. cholerae* O1 e não-O1 isoladas durante a epidemia de cólera em São Paulo, Brasil (GONÇALVES et al., 2004). O gene da toxina colérica (*ctx*) é essencial para causar a doença, sendo encontrada apenas em cepas de *V. cholerae* O1 e O139 (GOEL et al., 2007).

Aproximadamente 20% dos indivíduos infectados com *V. cholerae* toxigênico desenvolve uma diarreia aquosa aguda, sendo que em 10 a 20% dos casos, esta evolui para uma diarreia grave com a presença de vômito. Sem tratamento imediato e adequado, a infecção promove uma desidratação intensa levando o indivíduo a morte (SANTOS & VIERA, 2013).

#### 4. Conclusão

As estirpes de *Vibrio cholerae* provenientes do estuário de São Francisco do Conde, Bahia, apresentaram elevada suscetibilidade antimicrobiana, não expressando toxigenicidade.

## 5. Agradecimentos

A FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro a este trabalho. A equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela ajuda e apoio constante. A equipe do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR da Universidade Federal do Ceará, em especial a Dra. Francisca Gleire Menezes e Dra. Cristiane Teles e Daniel Rodrigues.

## 6. Referências

BACCARO, M.R., MORENO, A.M., CORRÊA, A., FERREIRA, A.J.P., & CALDERARO, F.F. (2002) Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69, 15-18.

BALSALOBRE, L.C., DROPA, M., LINCOPAN, N., MAMIZUKA, E. M., MATTE, G. R., & MATTE, M.H. (2009) Detection of metallo- $\beta$ -lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 142-145.

BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L., & CANTÓN, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 260-265.

BERQUÓ, L.S., BARROS A.J.D., LIMA, R.C., & BERTOLDI, A.D. (2004). Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. *Revista de Saúde Pública*, 38, 239-246.

BLOKESCH, M., & SCHOOLNIK, G.K. (2007) Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathogens*, 3, 81.

BRASIL (2011) Resolução - RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como

antimicrobianos. DOU Nº 87, Seção 1, p. 39-41. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2011.

CABRERA-RODRÍGUEZ, L. E., BRAVO-FARIÑAS, L., RAMÍREZ-ÁLVAREZ, M. M., LLOP-HERNÁNDEZ, A., FERNÁNDEZ-ABREU, A., MORIER, L., & BORREGO-HERNÁNDEZ, G. (2008) Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Revista Biomédica*, 19, 138-144.

CARINAI, A., PIANO, A., CONSOLANDI, C., SEVERGNINI, M., CASTIGLIONI, B., CAREDDA, G., CANDELA, M., SERRATORE, P. BELLIS, G., & TINTI, F. (2012) Detection and characterization of pathogenic vibrios in shellfish by a Ligation Detection Reaction-Universal Array approach. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 474-482.

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

COSTA, R.A., VIEIRA, G.H.F., SILVA, G.C., VIEIRA, R.H.S.F., & SAMPAIO, S.S. (2008) Susceptibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45, 458-462.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (2003) Approved Standard- 6<sup>o</sup> Edition. Document M7-A6.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; approved Guideline (2010). M49-A, 26, 50.

CRESTANA, G. B., & SILVA, J. H. (2011) Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado. *Revista Internacional de Direito e Cidadania*, 9, 55-65.

DÍAZ, R.A.J., PITA, M.T.S., ALEMÁN, Z.W., RUBALCABA, S.C., GONZÁLEZ, M. I.G., ROSA, O.E.D., & SALAZAR, M.C.R. (2006) Sensibilidad antimicrobiana em bactérias de origen ambiental. *Revista Higiene y Sanidad Ambiental*, 6, 150-159.

FIGUEIREDO, D.Q. de, CASTRO, L.F.S., SANTOS, K.R.N., TEIXEIRA, L.M., & MONDINO, S.S.B. (2009) Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45, 177-184.

FONTOURA, M., ARAUJO, T., & SANCHES, L. 2009 *Caracterização geral do município de São Francisco do Conde*. São Francisco do Conde: Prefeitura Municipal de Sao Francisco do Conde. 22p. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/22932852/135843512/name/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o+de+S%C3%A3o+Francisco+do+Conde-atualizado+08+out+2009.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2014.

GOEL, A.K., PONMARIAPPAN, S., KAMBOL, D.V., & SINGH, L. (2007) Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Folia Microbiologica*, 52, 81-85.

GOEL, A.K., JAIN, M., KUMAR, P., & JIANG, S.C. (2010) Molecular characterization of *Vibrio cholerae* outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. *World journal of microbiology & biotechnology*, Germany, 26, 281-287.

GONÇALVES, E.G.R., LOPES, M.J.S., OLIVEIRA, E.G., & HOFER, E. (2004) Associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton de águas estuárias da Baía de São Marcos/São Luis - MA, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37, 318-323.

HAN, F., WALKER, R.D., JANES, M.E., PRINYAWIWATKUL, W., & GE, B. (2007) Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7096-7098.

IKEDA, Y., MAMIYA, T., NISHIYAMA, H., NARUSAWA, S., KOSEKI, T., MOURI, A., & NABESHIMA, T. (2012) A permission system for carbapenem use reduced incidence of drug-resistant bacteria and cost of antimicrobials at a general hospital in Japan. *Nagoya Journal of Medical Science*, 74, 104.

ISLAM, M.S., & TANAKA, M. (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 624-649.

ISMAIL, H., SMITH, A.M., TAU, N.P., SOOKA, A., & KEDDY, K.H. (2013) Cholera outbreak in South Africa, 2008–2009: Laboratory analysis of *Vibrio cholerae* O1 strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 208, 39-45.

MACEDO, M. de L. de A.P., CARTAXO, R. de S., ALMEIDA, T.C. da C., SOUZA, L.B.S. de, W.J.S., & COUTINHO, H.D.M. (2005) Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 7, 59-63.

MANJUSHA, S., & SARITA, G.B. (2013) Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant Vibrios isolated from molluscan and crustacean of Kerala. *International Food Research Journal, Barking*, 20, 77-86.

MARKMAN, C. V. (2009) Caracterização de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras da região costeira do estado de São Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de tanques de lastro de navios. (Tese) 192f. Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOLINA-AJA, A., GARCÍA-GASCA, A., ABREU-GROBOIS, A., BOLÁN-MEJÍA, C. ROQUE, A., & GOMEZ-GIL, B., (2002). Plasmid profiling and antibiotic resistance

of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, 213, 7-12.

MONTEIRO, L., VAN-DÚNEM, F. R., VILARES, A., SAMI, J., OLIVEIRA, E., & SILVA, F. G. da. (2013). Detecção molecular de *V. cholerae* O1 e O139 e caracterização genotípica dos fatores de virulência em estirpes clínicas de *V. cholerae* isoladas em Angola: resultados preliminares. *Instituto Nacional de Saúde*, 10, 25-27.

NOGUEROLA, I., & BLANCH, A. R. (2008). Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*. 105, 175–185.

OLIVEIRA, J.F.P., CIPULLO, J.P., & BURDMANN, E.A. (2006) Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 21, 444-452.

OKUDA, J., RAMAMURTHY, T., & YAMASAKI, S. (2007). Antibacterial activity of ciprofloxacin against Clinical Strain of *Vibrio cholerae* O139 recently Isolated from India. *Yakugaku Zasshi*, 127, 903-904.

PICOLI, S.U. (2008) Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40, 273-277.

RAYCHOUDHURI, A., TAPAS, P., KAUSIK, G., THANDAVARAYAN, R., NANDY, R.K., TAKEDA, Y., NAIR, G. B., & MUKHOPADHYAY, A.K. (2009). Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 131-132.

RAISSY, M., MOUMENI, M., ANSARI, M., & RAHIMI, E. (2012). Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11, 618-626.

RISTORI, C.A., ROWLANDS, R.E.G., JAKABI, M., GELLI, D.S., SCOLA, M.C.G., & GASPARI, E.N. (2006) Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando

anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 65, 127-132.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., & MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. ed, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

SANTOS, L.F.P. (2011) *Avaliação dos teores de cádmio e chumbo em pescado proveniente de São Francisco do Conde, Bahia*. (Dissertação), Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde. 75p.

SANTOS, C.A.M.L., & VIEIRA, R.H.S.F. (2013) Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55, 219-228.

SOUSA, O.V. de, VIEIRA, R.H.S. dos F., MENEZES, F.G.R. de, REIS, C.M.F. dos, & HOFER, E. (2004). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46, 59-62.

SVS- Secretária de Vigilância Sanitária (2008). Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera, Editora MS, Brasília, 168.

UENO, M., & CARDOSO JORGE, A.O. (2001) Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. *Revista de biociências*, 7, 15-22.

ULLOA F.M.T., PORTE, T.L., BRAUN J.S., DABANCH P.J., FICA C.A., HENRÍQUEZ, A.T., & OSORIO A.C.G. (2011) Gastroenteritis aguda causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad Vpal-7. *Revista chilena de infectologia*, 28, 470-473.

WALSH, T.R., BOLMSTROM, A., QWARNSTROM, A., & GALES, A. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2755-2759.

WONG, H.-C., YOU, W.-Y., & CHEN, S.-Y. (2012) Detection of toxigenic *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oyster by multiplex-PCR with internal amplification control. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20, 48-58.

YONG, D., LEE, K., YUM, J.H., SHIN, H.B., ROSSOLINI, G.M., & CHONG, Y (2002). Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3798-3801.

VASCONCELOS, F.R., REBOUÇAS, R.H., EVANGELISTA-BARRETO, N.S., SOUSA, O.V., de, & VIEIRA, R.H.S.F. (2010) Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do Açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77, 405-410.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com os dados gerados por esta pesquisa esperam contribuições acerca de micro-organismos indígenas em ambientes aquáticos causadores de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), servindo de alerta para a população quanto ao risco do consumo de moluscos bivalves *in natura* ou insuficientemente cozidos.
- O processo de degradação dos estuários devido principalmente ao impacto antropogênico veiculado pelas indústrias e descarte de efluentes residenciais, afeta a microbiota residente.
- Espera-se sensibilizar as autoridades responsáveis do município da importância da implantação de sistemas de saneamento básico, uma vez que o descarte contínuo de resíduos de antimicrobianos nos corpos hídricos compromete a microbiota do ambiente, podendo afetar a saúde das comunidades que habitam as margens do estuário, principalmente crianças e imunocomprometidos.
- Além disso, espera-se que as autoridades brasileiras, responsáveis pela legislação de alimentos, possam estabelecer parâmetros aceitáveis destes micro-organismos nos alimentos ou águas recreativas, visto que são responsáveis por DVAs.

# ANEXO

## ➤ Normas Revista Food Microbiology

### INTRODUCTION

#### ***Types of article***

Original research papers for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short research notes describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short reviews on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the Editor before preparing a manuscript.

### BEFORE YOU BEGIN

#### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### ***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923/](http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/).

### ***Submission declaration***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### ***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### ***Copyright***

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

### *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### *For Open Access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should

be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### ***Open access***

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder.

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No Open Access publication fee all articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative

works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including

notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

#### *Additional information*

Nomenclature and Descriptions of Organisms the correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

## **PREPARATION**

### ***Use of wordprocessing software***

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

### ***Article structure***

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ***Essential title page information***

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 200 words.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file

name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### ***Nomenclature and units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt

for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Appropriate indications of replication and variability should be included.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link

creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same

author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.