



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

FATIMA CRISTIANE TELES DE CARVALHO

***Salmonella* spp. E *Escherichia coli* EM AMBIENTES DE CULTIVO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei*) NO ESTADO DO CEARÁ**

FORTALEZA

2012

FATIMA CRISTIANE TELES DE CARVALHO

***Salmonella* spp. E *Escherichia coli* EM AMBIENTES DE CULTIVO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei*) NO ESTADO DO CEARÁ**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos

Orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

C323s Carvalho, Fátima Cristiane Teles de

Salmonella spp. e *Escherichia coli* em ambientes de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no Estado do Ceará / Fátima Cristiane Teles de Carvalho. – 2012.
82 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Utilização e manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

Orientação: Prof^a. Dr^a Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Carcinicultura. 2. Bactérias – Multirresistência. 3. Virulência (Microbiologia) I. Título.

CDD 639.543

FATIMA CRISTIANE TELES DE CARVALHO

***Salmonella* spp. E *Escherichia coli* EM AMBIENTES DE CULTIVO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei*) NO ESTADO DO CEARÁ**

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Ernesto Hofer
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Aos meus pais, Maria de Jesus Costa Teles e Gerardo Pereira Teles, meus maiores incentivadores, que sempre acreditaram no meu potencial. Obrigada por tudo. EU AMO VOCÊS.

Ao Prof. Dr. Gustavo Hitzschky dos Fernandes Vieira (*in memoriam*), um exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem atribuo toda minha força de vontade e determinação.

À Nossa Senhora, que sempre esteve ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis da minha vida.

Ao Prof. Ernesto Hofer pela orientação, incentivo, dedicação e contribuição nessa pesquisa.

Ao André Luis Crisóstomo, razão do meu viver, pelo seu amor, dedicação, paciência, compreensão, amizade. Sem ti eu não teria chegado aqui. EU TE AMO.

À Prof^a Silvana Saker Sampaio, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Eliane Moura Falavina dos Reis e Christiane Moura Falavina dos Reis, do laboratório de Enterobacterias IOC- FIOCRUZ-RJ, por toda contribuição na identificação das cepas de *Salmonella* e pela amizade com que sempre me atenderam.

Minha eterna admiração e amizade à Prof^a Norma Suely Evangelista-Barreto, que sempre me ensinou a nunca desistir dos meus ideais. Você é muito especial na minha vida. Mesmo distante se fez presente.

À minha amiga Edirsana Carvalho (recruta), um regalo na minha vida, pois sua alegria contagia o ambiente de trabalho e tudo se torna mais fácil. Minha eterna gratidão.

À minha amiga Gleire Rodrigues, pelo incentivo, apoio e dedicação na Biologia Molecular e nas coletas de campo. Obrigada por sua amizade.

À minha amiga Karla, sempre determinada e alegre; obrigada pelo apoio e amizade.

À minha amiga Renata Albuquerque (Renatinha), com quem aprendi a ser objetiva e perseverante. Obrigada por tudo, principalmente, pela sua amizade.

À Marina Rodriguez e Daniel Rodrigues pela sua dedicação, compreensão, paciência e principalmente pela amizade.

Ao Ricardo Albuquerque (Ricardinho) por sua ajuda nas coletas e sua amizade.

Aos colegas do doutorado em especial o meu grande amigo Carlos Holanda (estressadinho).

Às eternas Reginetes: Anahy Lima, Cleidenora Souza, Rosa Rebouças, Regina Coeli, Waleska Albuquerque e Susy Margela.

Aos meus colegas de laboratório: Adalva Machado, Alberto Gomes, Beatrice Veras, Camila Magalhães, Camilla Brandão, Cecília Pinho, Denise Monteiro, Giselle Silva, Iara Pimentel, Isabel Kalene, Jackson Peixoto, Lana Leite, Larissa Caminha, Ludmila Conde, Rafael Rocha, Rayza Araújo, Soraya Neves e Morgana Oliveira por toda colaboração ao longo desta pesquisa.

À Dra. Francinete Giffoni pelo apoio psicológico.

Ao Prof. Rodrigo Maggioni, por toda sua compreensão e ajuda na Biologia Molecular.

À Cândida Vila-Nova e João Mafaldo, por toda ajuda na Biologia Molecular.

Ao João Batista pelos cuidados na minha alimentação e dedicação nessa caminhada.

Às tias Leonor Costa, Maria José Costa (Mazé) e Célia Teles que sempre me apoiaram e incentivaram minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos Joália Teles, Joélia Teles, Osmilton Teles, sobrinhos Breno Luis Teles, João Davi Teles, Gabriel Teles, Beatriz Teles e Vinicius Teles.

Aos cunhados Wagner Vital e Neta Sousa, por todo incentivo durante esta caminhada.

Aos meus sogros Brito Carvalho e Crisantina Carvalho por todo apoio, compreensão e paciência.

Ao Luis Bezerra (Buda) pela ajuda nas configurações dos mapas.

À CAPES-PROPAG pela concessão da Bolsa de Estudo durante o curso.

À Rosângela e Gorete por toda a sua compreensão e paciência.

Ao Sr. Edílson, Francisco Gomes, Wagner Silva, Sr. Chico, Célia, Zuíla e Juliana Santos.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Gustavo Hitzschky dos Fernandes Vieira (*in memoriam*) a quem devo o meu desenvolvimento científico e o meu aprendizado. Obrigada por ter acreditado em mim no início da minha vida acadêmica. Eterna saudade. Sua filha de laboratório (ETERNA GUGUETE).

À minha orientadora Prof^ª Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (minha chefinha) um exemplo de profissional, uma pesquisadora de renome, que me ensinou a fazer Ciência. Obrigada por toda confiança amizade e incentivo nos momentos mais difíceis. Sua filha de laboratório (ETERNA REGINETE).

À minha co-orientadora Prof^ª Oscarina Viana de Sousa (Osquinha) sempre afetuosa e prestativa. Uma dádiva na minha vida e para o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado. A ela devo toda dedicação, amizade, carinho e compreensão. Obrigada por sua ajuda incomensurável durante a minha Tese de Doutorado.

RESUMO

Bactérias de origem fecal como *Escherichia coli* e *Salmonella* são frequentemente isoladas de corpos aquáticos dulcícolas e ou marinhos o que acarreta problemas econômicos para cultivos de organismos aquáticos destinados a alimentação humana, pois estão diretamente relacionados à qualidade dos produtos e à saúde dos consumidores. Outra preocupação é com a crescente resistência destas bactérias a antibióticos no ambiente aquático resultante, principalmente, do uso indiscriminado dessas drogas na profilaxia humana e animal. Considerando o exposto, o objetivo da pesquisa foi monitorar a presença de bactérias entéricas (*E. coli* e *Salmonella* spp.) em áreas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) aclimatado a água doce em duas fazendas situadas em Jaguaruana-CE, analisando os padrões de resistência a antimicrobianos. De cada fazenda foram coletadas amostras de sedimento e água dos viveiros além do afluente próximo. A estimativa do número de *E. coli* nas amostras de água e sedimentos dos viveiros e do rio abastecedor foram semelhantes para as duas fazendas. Foram isoladas 265 cepas suspeitas de *E. coli* sendo confirmadas 50 (18,87%) através de testes bioquímicos. Entre 186 cepas suspeitas de *Salmonella*, 30 (16,13%) foram confirmadas como pertencentes ao gênero, sendo cinco diferentes sorovares: *S. sor. Saintpaul*, *S. sor. Infantis*, *S. sor. Panama*, *S. sor. Madelia*, *S. sor. Braenderup*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *enterica*. Os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e salinidade) não influenciaram no isolamento das cepas de *E. coli* ou *Salmonella*. Não houve relação entre o NMP de *E. coli* e o isolamento de *Salmonella* entre as amostras analisadas. Foi observada resistência à TET, AMP e OTC em 32% das cepas de *E. coli* com 50% desses apresentando fenótipo relacionado a plasmídeo. Entre as estirpes de *Salmonella*, 16,67% se mostraram resistentes à TET, OTC, AMP e NIT. Apenas a resistência à NIT foi estabelecida como de origem plasmidial. Para TET e OTC, os isolados de *E. coli* apresentaram CIM de 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM de $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, a CIM e CBM para TET, OTC e NIT nas *Salmonella* foram de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $>12.800 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Através da análise dos perfis genotípicos dos isolados de *Salmonella* não foi possível estabelecer padrões de dispersão dos sorovares no ambiente. A presença dos genes *pefA* e *invA* que codificam fatores de virulência nas culturas de *Salmonella* foi independente do sorovar e da origem ambiental dos isolados.

Palavras-chave: Bactérias entéricas, multirresistência, virulência e carcinicultura.

ABSTRACT

Bacteria of fecal origin, such as *Escherichia coli* and *Salmonella*, are frequently isolated from freshwater or marine waters, originating economic problems to the cultivation of aquatic organisms for human consumption. Another concerning factor is the growing resistance to antibiotics in the aquatic environment, due to its indiscriminate use for both human and animal prophylaxis. This considered, the following research aims at monitoring the presence of enteric bacteria (*E. coli* and *Salmonella* spp.) in areas of two freshwater acclimated shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation farms in Jaguaruana-CE, establishing antimicrobials resistance patterns. Sediment and water samples were gathered from ponds and nearby water streams from each farm. The estimated number of *E. coli* from both the pond and the main river samples were similar in all sources. Two hundred sixty-five (265) strains suspected of *E. coli* were isolated, 50 (18.87%) of those suspicions were confirmed by biochemical tests. Among the 186 strains suspected of *Salmonella*, 30 (16.13%) belong to the genus, with five different serovars: *S. ser. Saintpaul*, *S. ser. Infantis*, *S. ser. Panama*, *S. ser. Madelia*, *S. ser. Braenderup*, *S. enterica* subsp. *Houtenae* and *S. enterica* subsp. *enterica*. Physicochemical parameters (temperature, pH and salinity) did not have any influence on the isolation of *E. coli* or *Salmonella* strains. There was no relation between the *E. coli* MPN and *Salmonella* isolation among the analyzed samples. Resistance to TET, AMP and OTC was observed in 32% of the *E. coli* strains, where half of this percentage presented a plasmid-related phenotype. Resistance to TET, OTC, AMP and NIT was observed in 16.67% of the *Salmonella* strains. Only NIT resistance was considered of plasmid origin. Concerning TET and OTC, the *E. coli* isolates presented a MIC of 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and MBC of $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$; whereas the MIC and MBC for TET, OTC and NIT in the *Salmonella* strains were 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and $>12,800 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. According to the analysis of the genotypic profiles from the *Salmonella* isolates, it was not possible to determine the dispersion pattern of its serovars in the environment. The presence of *pefA* and *invA* genes was independent from both the serovar and environmental origin of the isolates.

Key Words: Enteric bacteria, multidrug resistance, virulence, shrimp culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Percentual de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos de 50 estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas A e B.....	49
Gráfico 2	Percentual de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos de 30 estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas A e B.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Localização geográfica das fazendas (A e B) de cultivo de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , adaptado a água doce, e do ponto do rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas, em Jaguaruana- CE.....	28
Figura 2	Fluxograma para identificação de <i>Escherichia coli</i> em amostras de água.31	
Figura 3	Fluxograma para identificação de <i>Escherichia coli</i> em amostras de sedimento.....	32
Figura 4	Fluxograma para identificação de <i>Salmonella</i> a partir de amostras de água...33	
Figura 5	Fluxograma para identificação de <i>Salmonella</i> a partir de amostras de sedimento.....	34
Figura 6	Fluxograma da técnica do antibiograma realizado com os isolados das amostras de água e sedimento coletados nas fazendas A e B e do ponto do rio abastecedor, em Jaguaruana-CE.....	36
Figura 7	Fluxograma do procedimento de pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) de concentração bactericida mínima (CBM) realizado com os isolados de <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> das amostras de água e sedimento coletados nas fazendas A e B e do ponto do rio abastecedor, Jaguaruana-CE.....	38
Figura 8	Fluxograma do procedimento de cura plasmidial, realizado com os isolados de <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> das amostras de água e sedimento coletados nas fazendas A e B e do ponto do rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas, em Jaguaruana-CE.....	39
Figura 9	Perfil de similaridade de isolados de <i>Salmonella</i> de amostras ambientais, baseado na presença e ausência de bandas no gel de BOX-PCR das amostras de água e sedimento.....	64
Figura 10	Detecção dos genes de virulência Multiplex-PCR de <i>Salmonella</i> em amostras ambientais.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de <i>Salmonella</i>	40
Tabela 2	Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de <i>Salmonella</i>	40
Tabela 3	Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de <i>Salmonella</i>	41
Tabela 4	Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para as estirpes de <i>Salmonella</i>	42
Tabela 5	Parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) das amostras de água de um viveiro de cultivo e do Rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas A e B.....	43
Tabela 6	Número mais provável (NMP/100 mL e NMP/g) de <i>Escherichia coli</i> e indicação das amostras nas quais foram isoladas <i>Salmonella</i>	46
Tabela 7	Comparação entre a presença de <i>Salmonella</i> , sorovares predominantes e o isolamento de <i>Escherichia coli</i> (NMP \geq 10), na amostra de água das duas áreas de cultivo de camarão marinho aclimatado.....	48
Tabela 8	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre as cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras ambientais dos viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.....	51
Tabela 9	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de antibióticos contra bactérias <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras ambientais de viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.....	52
Tabela 10	Estirpes de <i>Salmonella</i> spp. detectadas em amostras de água e sedimento de viveiros das fazendas A e B e do Rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas.....	53
Tabela 11	Perfil de resistência a antimicrobianos entre as estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.....	59
Tabela 12	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de antibióticos contra bactérias <i>Salmonella</i> spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento de viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.....	60
Tabela 13	Resultados de Multiplex-PCR de <i>Salmonella</i> para detecção dos genes de virulência.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
CBM	Concentração bactericida mínima
CLO	Cloranfenicol
CIM	Concentração mínima inibitória
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CT	Coliformes Termotolerantes
DTA	Doenças transmitidas por alimento
EMB	Eosina azul de metileno
FDA	Food and Drug Administration
FLO	Florfenicol
GEN	Gentamicina
I	Intermediária
IRA	Índice de resistência a antimicrobianos
LB	Luria-Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRA	Múltipla resistência a antimicrobianos
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	Ácido nalidíxico
NIT	Nitrofurantoina
NMP	Número mais provável
OTC	Oxitetracilina
PCR	Reação de cadeia de polimerase
R	Resistente
S	Sensível

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
mm	Milímetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	<i>Escherichia coli</i>	20
2.1.1	Características gerais.....	20
2.2	<i>Salmonella</i>	21
2.2.1	Características gerais.....	21
2.3	Fatores potenciais de virulência.....	23
2.3.1	Ilhas de Patogenicidades	24
2.3.1.1	Ilhas Genômicas de <i>Salmonella</i>	24
2.4	Importância social e econômica da carcinicultura.....	25
2.5	Resistência a antimicrobianos.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Procedimento de coleta.....	28
3.1.1	Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	29
3.1.2	Amostras de água.....	29
3.1.3	Amostras de sedimento.....	29
3.2	Quantificação e identificação de <i>Escherichia coli</i>	29
3.3	Investigação de <i>Salmonella</i>	32
3.4	Sorotipagem de <i>Salmonella</i>	35
3.5	Teste de antibiograma através do método de difusão em discos (Teste de Kirby-Bauer).....	35
3.6	Cálculo do índice de resistência (IRA) e Determinação do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MRA).....	37
3.7	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM).....	38
3.8	Técnica da “cura” de plasmídeo.....	38
3.9	Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	39
3.9.1	Extração de DNA cromossômico das cepas de <i>Salmonella</i>	39
3.9.2	Condições do BOX-PCR.....	40
3.9.3	Condições da PCR para detecção dos genes de virulência.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	Variação dos parâmetros físico-químicos das amostras ambientais das fazendas A e B.....	43

4.2	Quantificação de <i>Escherichia coli</i> em amostras ambientais de viveiro de cultivo e do Rio Jaguaribe.....	44
4.3	Susceptibilidade das cepas de <i>Escherichia coli</i> aos antimicrobianos.....	49
4.4	Detecção de estirpes de <i>Salmonella</i> spp. em amostras ambientais de viveiro de cultivo e do rio abastecedor das fazendas A e B.....	52
4.4.1	Susceptibilidade das cepas de <i>Salmonella</i> aos antimicrobianos.....	55
4.4.2	Box-PCR.....	63
4.4.3	Detecção dos genes de virulência.....	65
5	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura ocupa uma posição de destaque no contexto do setor pesqueiro brasileiro, tanto do ponto de vista da organização da cadeia produtiva, como da participação na geração de emprego e renda (ROCHA, 2007; 2011). Entretanto, o desenvolvimento acelerado da atividade de cultivo de camarões propiciou condições para o surgimento de doenças e a fácil transmissão de microrganismos patogênicos nos locais de cultivo (BOAVENTURA; CANUTO; FERREIRA, 2006; SERRANO, 2005). Diante desse quadro, ocorreu uma banalização na utilização de substâncias com atividade antimicrobiana para o tratamento e até prevenção de doenças nos sistemas de cultivo. Essa utilização indiscriminada de antimicrobianos vem sendo relacionada ao aumento da resistência em bactérias potencialmente patogênicas contaminantes do ambiente aquático.

Desde o século passado, o índice de cepas bacterianas antibiótico-resistentes tem aumentado no ambiente aquático. Este processo é resultante do uso inadequado de antibióticos na terapêutica humana e animal e do emprego dessas substâncias nos cultivos intensivos de animais (HARAKEH; YASSINEA; EL-FADELB, 2006). Esse aumento também está ligado à disseminação de plasmídeos que possuem genes de resistência, proporcionando uma maior flexibilidade genética em populações microbianas para adaptações e sobrevivência em ambientes hostis (CARDONHA *et al.*, 2005). O uso de antibióticos nas rações, visando efeito profilático, ou no tratamento de infecções animais, ou como promotor de crescimento, tem contribuído para a perpetuação de estirpes resistentes e patogênicas (PINTO, 2000).

A transferência horizontal de genes é um fator determinante para a disseminação de resistência e é um mecanismo que ocorre naturalmente no ambiente fazendo com que microrganismos de espécies diferentes apresentem comportamento similar frente aos antimicrobianos. Exemplo disso é o que ocorre entre a espécie *Escherichia coli* e as do gênero *Salmonella*, enterobactérias com potencial patogênico e presentes em ambientes aquáticos em áreas onde não existe infra-estrutura sanitária adequada. Esse mecanismo de transferência exerce um papel crucial no aumento de cepas resistentes espalhadas no ambiente (HARAKEH; YASSINEA; EL-FADELB, 2006). Patógenos humanos e genes de resistência podem circular entre humanos, animais e diferentes ecossistemas pelo contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY *et al.*, 1998).

De acordo com Seyfried *et al.* (2010), comunidades autóctones de ambientes aquáticos podem servir como reservatório de resistência a antibióticos. Entretanto, a

contribuição das atividades antropogênicas para o desenvolvimento de reservas ambientais de resistência a antibacterianos não está completamente esclarecida.

Segundo Cabello (2004), o aumento de cepas resistentes a antibióticos, além de ser um problema biológico, é um problema médico, social, econômico e ético, dado que as infecções produzidas pelas bactérias resistentes causam maiores taxas de morbidade e mortalidade (SILVA; DUARTE, 2002). Existe um consenso, em vários países, de que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal é um dos principais responsáveis pelo aumento da resistência antimicrobiana.

Para Balcázar *et al.* (2006), a emergência de uma grande variedade de patógenos e de resistência bacteriana são alguns dos impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de agentes quimioterápicos em aquicultura.

A contaminação do homem por bactérias Gram-negativas através de alimentos de origem marinha é de interesse para a saúde pública. Nesse contexto, se destacam os sorovares de *Salmonella* que podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro ou podem ser ubiqüitários (CAMPOS, 2004). Sendo assim, o comportamento desses patógenos frente aos antimicrobianos também é um fator extremamente importante e preocupante para as agências de Saúde Pública.

Bactérias de origem fecal tais como *Salmonella* e *Escherichia coli* são frequentemente isoladas de corpos aquáticos dulcícolas ou marinhos (MELO *et al.*, 1997), o que acarreta problemas econômicos para os cultivos, pois estão diretamente relacionados à qualidade dos produtos e à saúde dos consumidores.

O presente estudo teve como objetivo monitorar a presença de bactérias entéricas (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp.) em áreas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) aclimatado a água doce em duas fazendas situadas em Jaguaruana-CE, estabelecendo padrões de resistência a antimicrobianos. Como objetivo específico, citam-se: (1) quantificar e identificar *E. coli* em amostras de água e sedimento nas áreas de cultivo de camarão; (2) pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de água e sedimento das fazendas de cultivo; (3) determinar o perfil fenotípico de resistência a substâncias antimicrobianas das cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas e identificadas em amostras de água e sedimento das fazendas de cultivo, através de antibiograma; (4) pesquisar a presença de cepas com perfil de multiresistência aos antimicrobianos testados; (5) determinar a presença de plasmídeos relacionados aos perfis de multiresistência das cepas isoladas; (6) determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram um perfil de resistência; (7) verificar a presença de diferentes ecotipos entre os sorovares de *Salmonella* através de análise de DNA cromossômico

utilizando técnica de Box-PCR; (8) pesquisar a presença dos genes de patogenicidade (*pefA*, *invA* e *spvC*) dos sorovares de *Salmonella* isolados utilizando a técnica de Multiplex-PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Características gerais

Em 1885, Theodor von Escherich descreveu um organismo isolado de fezes de crianças, denominado *Bacillus coli communis*, também chamado *Bacillus coli*, que em sua homenagem foi finalmente denominado *Escherichia coli* (TÔRRES, 2004).

A bactéria *Escherichia coli* possui forma de bastonetes retos de tamanho de aproximadamente 1,1 a 1,5 μm x 2,0 a 6,0. É uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, oxidase negativa, podendo ser móvel ou imóvel. Quando móvel locomove-se pelo ambiente aquoso através de flagelos peritríquios (TÔRRES, 2004).

A espécie *E. coli* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo caracterizada pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glicuronidase. Cresce em meio complexo a 44-45 °C, fermenta a lactose e manitol com produção de ácido e gás, e produz indol a partir do aminoácido triptofano (TRABULSI; ALTERTHUM 2008),

Para Vieira *et al.* (2008) essa bactéria é considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal recente e da eventual presença de organismos patogênicos, podendo ser usada como indicador fecal na orientação para a utilização de água para irrigação e para aqüicultura (EL-SHAFAI *et al.*, 2004).

Escherichia coli também tem grande significado clínico para o homem, devido ao seu papel como patógeno oportunista causando infecções no sangue, feridas, trato urinário etc. (KONEMAN *et al.*, 2001). É encontrada naturalmente nos intestinos de animais de sangue quente, inclusive em humanos.

2.2 *Salmonella*

2.2.1 *Características gerais*

Segundo Grimont; Weill. (2007) existem 2.579 sorotipos de salmonelas dentre os quais 2.531 pertencem à subespécie entérica. A classificação dessas bactérias, atualmente baseia-se na hibridação DNA-DNA, embora a literatura mostre que não há um consenso entre os taxonomistas. O gênero *Salmonella* apresenta duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica* abrangendo seis sub-espécies (I a VI): *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica* (LOURENÇO *et al.*, 2004). As salmonelas são sorotipadas de acordo com seus antígenos somático (O), envoltório (Vi) e flagelar (H). Os antígenos O designados por algarismos arábicos (1, 2, 4 etc.) caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*, enquanto os antígenos H são designados por letras minúsculas do nosso alfabeto (fase 1) e por algarismos arábicos (fase 2). Como o número de antígenos flagelares é superior aos números de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com vários expoentes numérico ($z^4, z^6, z^{13}, z^{15}, z^{23}, z^{24}, z^{28}, z^{32}, z^{35}, z^{45}, z^{47}, z^{50}$ etc.). O antígeno Vi é de natureza polissacarídica está presente em apenas três sorovares de *Salmonella* (*S. sor. Typhi*, *S. sor. Paratyphi C* e *S. sor. Dublin*) (FERREIRA, CAMPOS 2008).

O gênero *Salmonella* inclui bacilos Gram-negativos, medindo 0,7 a 1,5 x 2 a 5 µm, sendo a maioria móvel com flagelos peritríquios e anaeróbios facultativos. A melhor temperatura para o crescimento das bactérias do gênero *Salmonella* é de 35°C; fermenta a glicose e outros carboidratos com produção de ácidos e usualmente gás. Dentre as características bioquímicas, as salmonelas são oxidase negativa, catalase positiva, indol e Voges-Proskauer negativas e positivas nas provas de sulfeto de hidrogênio, citrato de Simmons e lisina e ornitina descarboxilase (Le MINOR, 1984). Em relação aos parâmetros ambientais exigidos pela *Salmonella* salienta-se que, seu pH ótimo para multiplicação fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Com relação à concentração de sal, as salmonelas não toleram concentrações superiores a 9%, o nitrito é inibitório e seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal encontra-se na faixa de 35°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C (JAY, 2005).

No que concerne ao *habitat*, as salmonelas podem ser divididas em três categorias baseadas na especificidade do hospedeiro e no padrão clínico determinado: salmonelas altamente adaptadas ao homem incluindo *S. sor. Typhi* e *S. sor. Paratyphi A, B e C*, agentes da febre entérica (febres tifóide e paratifóide); salmonelas altamente adaptadas aos animais representadas por *S. sor. Dublin* (bovinos), *S. sor. Choleraesuis*, *S. sor. Typhisuis* (suínos), *S.*

sor. Pullorum e *S. sor. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo em animais. Entretanto, em determinadas situações (crianças, pacientes com doenças crônicas, idosos, imunocomprometidos) os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* podem determinar no homem, um quadro septicêmico, sendo mais grave, do que aquele causado por *S. sor. Typhi*. A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atinge indiferentemente ao homem e animais, designadas salmonelas zoonóticas, responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolite) ou doenças de transmissão alimentar (DTA) (LE MINOR, 1984).

Estima-se que os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B, C* infectam mais de 16 milhões de pessoas em todo mundo, e são responsáveis por mais de 600 mil mortes por ano (GRASSL; FINLAY, 2008).

Segundo Trabulsi e Alterthum (2008), a rota da bactéria no trato gastro-intestinal compreende a passagem pelo estômago e aderência às células epiteliais da região ileocecal com penetração nas células da mucosa causando injúria e, em seguida, migrando para uma lâmina própria. A resposta inflamatória do hospedeiro se dá com hipertrofia e hiperplasia dos folículos linfóides, mediada por liberação de prostaglandinas que estimulam a adenosina monofosfato (AMP) cíclico, produzindo ativa secreção de fluidos e resultando em diarreia. Os sintomas surgem em torno de 12 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado, embora já tenham sido relatados períodos mais curtos e mais longos. Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaléia e diarreias. Em média, a dose infectante se encontra em torno de 10^5 células, variando desde uma célula (*S. sor. Typhi*) até milhões (*S. sor. Derby* e *S. sor. Anatum*).

Segundo Rodrigues, Lázaro e Reis (2007), as salmonelas são eliminadas em grande número nas fezes, contaminando solo e água. A sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa, em particular na matéria orgânica, como por exemplo, a permanência por longo período, nas fezes secas. Existem registros dessas bactérias resistindo por mais de 28 meses em fezes de aves e, até 30 meses, em estrume bovino. No ambiente, foram recuperadas estirpes com até 280 dias em solo cultivado e 120 dias em pastagens, sendo ainda encontradas em efluentes de água de esgoto como resultado de contaminação fecal.

A salmonelose é uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em decorrência do grande número de animais envolvidos como fonte de infecção e, por conseguinte transmissores da bactéria em potencial. Embora a maioria dos surtos envolvendo essa bactéria tenha como veículos mais frequentes aves e ovos, uma ampla variedade de alimentos, incluindo carne bovina, peixe, sorvete e chocolate já foram implicados com a doença (DUFFY *et al.*, 1999; HOFER *et al.*, 2000). A salmonelose é de distribuição

cosmopolita, acometendo todas as faixas etárias, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (LOUREIRO *et al.*, 2010).

A salmonelose é uma das doenças infecciosas mais comuns dos seres humanos e animais e desde 1980 tem havido um aumento, em todo o mundo, no número de casos envolvendo *S. sor. Enteritidis* (RODRIGUES, TRAUXE; ROWE 1990).

No Brasil a aquicultura vem recebendo destaque nos últimos anos devido ao aumento na demanda mundial por alimento de origem aquática (REBOUÇAS, 2011). Segundo Sapkota *et al.* (2008), os impactos potenciais das atuais práticas utilizadas nas atividades aquícolas sobre a saúde humana são variáveis e muito distintos entre as regiões geográficas atingidas. Por outro lado, o fluxo de produtos derivados da aquicultura no mercado global expõe os consumidores aos contaminantes que podem advir das áreas de produção.

Carvalho *et al.* (2009) e Parente *et al.* (2011) pesquisando amostras ambientais de fazendas de camarão no Estado do Ceará, encontraram *Salmonella* em amostras de água e sedimento e de camarão. Os resultados indicaram uma contaminação por interferência antropogênica e pelo aporte de excrementos de animais no entorno das fazendas.

Além da ampla diversidade de fontes potenciais de contaminação e vias de transmissão, as características de endemicidade, morbidade e dificuldade de controle da doença justificam o interesse das agências de saúde (HOFER; SILVA; REIS, 1998).

Segundo Hofer e Reis (1994), nos países desenvolvidos, a incidência de salmonelose humana pode ser determinada corretamente, com a possibilidade de se fazer até a estimativa dos danos causados pela doença. No Brasil, a bibliografia avaliada acerca dos danos que *Salmonella* pode causar em saúde pública ainda é escassa, impossibilitando uma estimativa das perdas econômicas com a ocorrência de surtos. A escassez de dados epidemiológicos sobre casos de salmoneloses também se dá por causa da ocorrência de infecções humanas esporádicas que não entram nas estatísticas dos atendimentos ambulatoriais.

2.3 Fatores potenciais de virulência

De acordo com Sircilli e Trabulsi (2008), os fatores de virulência são estruturas produtoras ou estratégias que contribuem para aumentar a capacidade bacteriana de provocar infecções, podendo estar envolvidos com colonização ou lesão do organismo hospedeiro. Os fatores envolvidos com a colonização incluem adesão e invasão, enquanto os relacionados com lesão abrangem as endotoxinas e exotoxinas.

A virulência de *Salmonella* está ligada a uma combinação de fatores cromossômicos e plasmidiais. Segundo Hensel (2004), a maioria dos fenótipos de virulência são codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade (PAI), as quais também são referidas como ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI). As ilhas incluem a maioria dos fenótipos de virulência mais comuns, como por exemplo, a invasão da célula hospedeira e a patogênese intracelular. Algumas dessas SPI são conservadas no gênero *Salmonella* enquanto outras são específicas para alguns sorovares. Existem regiões cromossômicas com características de SPI, mas com função ainda não definida.

2.3.1 Ilhas de Patogenicidades

A elucidação da função e distribuição desses genes presentes nas SPI nos sorovares de *Salmonella* favorece a compreensão da evolução dos sorovares patogênicos e o papel das SPI na diferença da patogênese e epidemiologia entre os sorovares. As SPI codificam genes envolvidos na adesão de células do hospedeiro, invasão, sobrevivência dentro da célula, manipulação do sistema imune, em parte na especificidade do hospedeiro. Contribuem com a evolução genômica por transferência horizontal de genes. São as SPI, importantes ao influenciar traços como a resistência aos antibióticos, simbiose e adaptação em geral (DOBRINDT *et al.*, 2004).

2.3.1.1 Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*

Região de 40kb - Está associada à invasão de células não fagocíticas genes são de secreção do T3SS (Type 3 Secretory System).

A SPI- 1 está presente em *S bongori* e em todas as subespécies e sorovars de *S.enterica* analisadas até hoje.

O Locus SPI-2 tem 40kb em tamanho. Está ligada à capacidade de *Salmonella enterica* sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas das células eucarióticas.

SPI-3- Responsável pelo sistema de transporte de alta afinidade com o Mg^{2+} , é importante para o fenótipo de *Salmonella* intracelular.

SPI-4- O papel na virulência ainda não foi esclarecido e favorece o contato íntimo da bactéria com as microvilosidades da membrana apical.

SPI-5- Parece estar associada à enteropatogênese de *S. sor. Dublin*,

SPI-6- ou *Salmonella* Chromosomal Island (SCI) - Codifica muitos genes de virulência, mas o papel da SPI-6 em animais não foi elucidado.

SPI-7 ou Major Pathogenicity Islands (MPI)- Ligada a S sor. Typhi, Dublin e Paratyphi C fator codificado é o Ag Vi.

SPI-8- S. sor. Typhi- Fatores de virulência não específicos são os genes de bacteriocinas, mas nenhum dado funcional foi relatado até agora.

SPI-9- Organização semelhante a SPI-4.

SPI-10- Fatores de virulência codificados SPI-10. São fimbrias, determinantes na especificidade do hospedeiro S. sor. Typhi e Enteritidis (HENSEL, 2004).

2.3.1.2 Ilhas Genômicas de *Salmonella*

Cepas multirresistentes Typhimurium DT104, Paratyphi B e Agona. Este Locus chamado de ilha genômica de *Salmonella* 1 (SGI-1) tem um tamanho de 43kb. Dentro da SGI-1 genes conferem o fenótipo de penta resistência e estão agrupados em regiões de resistência a multidrogas compostas de dois integrons (HENSEL, 2004).

2.4 Importância social e econômica da carcinicultura

Segundo Rocha (2011), o agronegócio do camarão cultivado vem assumindo importância social crescente no Brasil, em especial na Região Nordeste, respondendo por 98% da produção nacional desse setor. Em 2011 existiam 1.200 produtores, envolvendo uma área de 18.500 hectares de viveiro e gerando 50.000 empregos. A produção desse setor em 2009 foi de 65.000 toneladas o que contribuiu para obtenção de uma receita de US\$ 300 milhões de dólares. Embora seja uma atividade consistente no Brasil, uma estimativa aponta um desenvolvimento de 3,3% do seu potencial da carcinicultura.

De acordo com a ABCC (2011), o estado do Ceará elevou sua produção de camarão em 50% em 2010, passando a ser o maior produtor de camarão cultivado do Brasil. O Rio Grande do Norte, teve uma queda de 23% em sua produção no mesmo período. Em 2009 o Ceará teve uma produção de 20.000 toneladas, em 2010, com um crescimento para 30.000 em 2010, enquanto que o estado vizinho caiu de 26.000 para 20.000 toneladas nesse mesmo intervalo de tempo.

Devido à expansão da atividade, o cultivo de camarões marinhos tem, cada vez mais, se tornado vulnerável a enfermidades causadas por agentes patogênicos tais como:

bactérias, protozoários, fungos e vírus, favorecidos pela facilidade de transmissão que ocorre nos locais de cultivo (FERREIRA, 2006).

Segundo Baquero, Martínez e Cantón (2008), o estudo do perfil de resistência a antimicrobianos entre as bactérias endógenas é de grande importância, uma vez que pode indicar o grau de alteração dos ecossistemas pela ação humana além de estabelecer o papel desses microrganismos como potenciais reservatórios para genes de resistência.

2.5 Resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos podem ser definidos como agentes quimioterápicos, substâncias químicas utilizadas no tratamento das doenças infecciosas e neoplásicas, em diversas concentrações toleradas pelo hospedeiro. Para Tavares (2007), os antibióticos são classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Os bactericidas provocam alterações incompatíveis com a sobrevivência bacteriana, enquanto os bacteriostáticos inibem o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata.

Segundo Tavares (2009), os antimicrobianos ao entrarem em contato com uma célula bacteriana geram várias modificações no metabolismo celular. Essas alterações vão desde o nível de parede celular até a interferência da replicação do DNA cromossômico; isso vai depender do tipo de fármaco utilizado e em que sítio de ação este irá atuar. Por exemplo: dentre os grupos de fármacos que atuam na síntese da parede celular destacam-se: as penicilinas, as cefalosporinas, os glicopetídeos, os monobactâmicos e as carbapenemas. Esses agentes causam alterações em nível de parede, ela é responsável por manter o equilíbrio osmótico no interior da célula. Quando a função osmótica é atingida por um agente antimicrobiano, ocorre a lise celular; tendo como resultado a formação de uma parede defeituosa, ou ausência de formação dos septos que dividem as células em multiplicação. Como consequência, ocorrerá uma hipertonicidade intracelular, entrando água do meio externo para o interno e por fim a morte bacteriana.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Entretanto, a disseminação do uso de antibióticos, lamentavelmente, fez com que os microrganismos desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento de resistência (BOWER; DAESCHEL; 1999; SILVEIRA *et al.*, 2006). Para Mota *et al.* (2005), o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde

animal e pública uma vez que elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registradas em estudos realizados nas diferentes espécies animais e no homem.

Em um ecossistema os resíduos de fármacos podem apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Pouco se sabe sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau esses resíduos possa afetá-los (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000).

Segundo Grave *et al.* (2006) e Vaz (2009), o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas resulta na seleção de bactérias. Estas não somente podem se tornar predominantes em uma população, como também podem ser reservatórios de genes de resistência, tornando-as capazes de transferir esse material genético para bactérias susceptíveis, que irão se tornar resistentes.

Os genes que conferem resistência podem ser codificados por plasmídeos, transposons e integrons que geralmente são mediadores de múltipla resistência. Esse tipo de transferência pode ocorrer entre diferentes gêneros e espécies de bactérias (QUINN *et al.*, 2005).

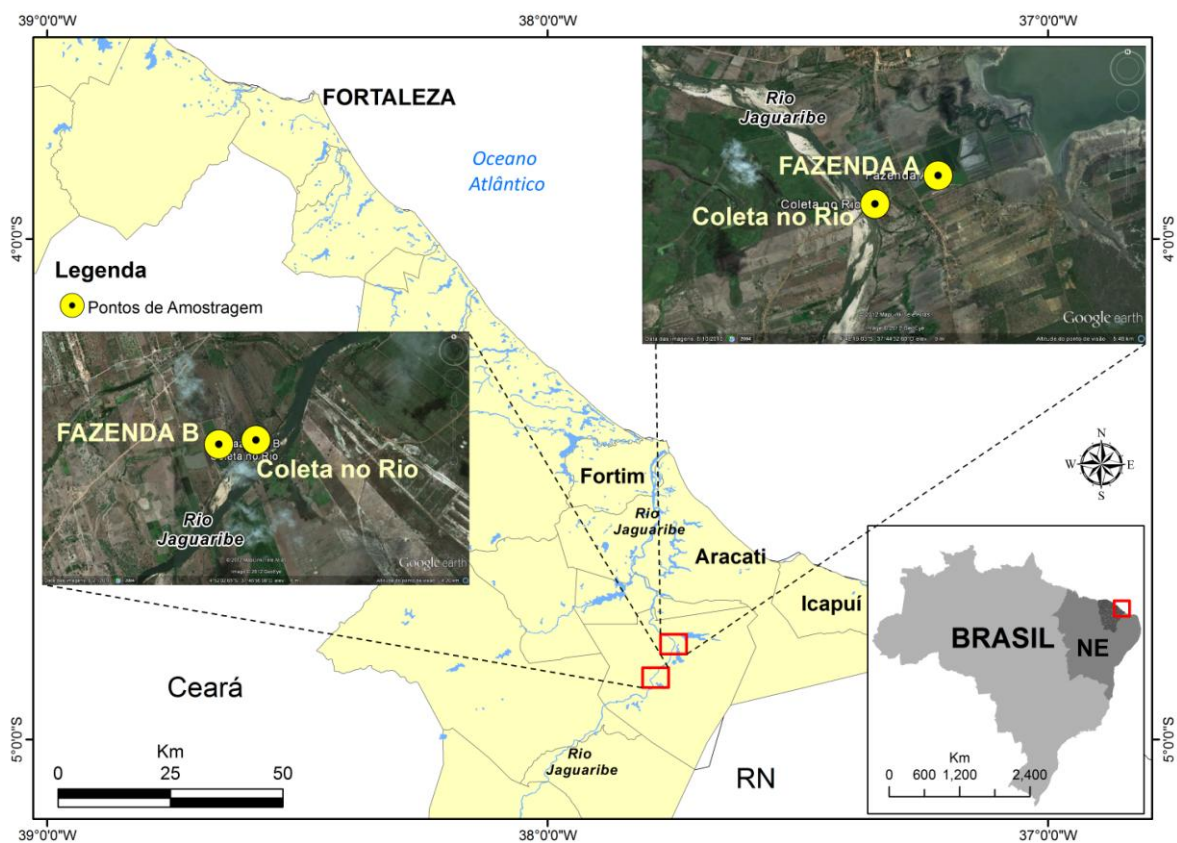
Vários fatores podem contribuir para que os microrganismos se tornem resistentes; mutações causadas por influência de fatores ambientais e/ou modificações genéticas intrínsecas da própria bactéria, que a partir de um determinado momento da sua multiplicação muda o seu genoma e passa por uma série de processos diferentes. No entanto, esses são processos raros que ocorrem em cada um bilhão ou um trilhão de multiplicações. O que determina essa predominância, de maneira geral, é a seleção que elas sofrem pelo uso dos antimicrobianos, e isso é mais constante em hospitais quando doses altas desses medicamentos são administradas por tempo prolongado, muitas vezes de maneira inadequada (LEÃO, 1999).

De acordo com Souza (1998), o desenvolvimento de resistência, por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas. Cinquenta por cento dos antibióticos produzidos são utilizados na terapia humana, a outra metade é empregada na profilaxia, tratamento ou como promotores de crescimento animal ou no extermínio de pragas na agricultura (RODRIGUES, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas duas fazendas (A e B) de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* adaptado à água doce, localizadas em Jaguaruana- CE e alimentadas pelo Rio Jaguaribe, no litoral leste do Estado do Ceará (Figura 1). Os locais de coleta foram georreferenciados com o uso de equipamento de geolocalização (GPS) Garmin III Plus. Os pontos de coleta no Rio e na Fazenda A estão localizados nas coordenadas $04^{\circ}48'24,4''S$; $037^{\circ}44'42,7''W$ e $04^{\circ}48'16,4''S$; $037^{\circ}44'15,4''W$. As coordenadas dos pontos de coleta no Rio e na Fazenda B são: $04^{\circ}52'0,54''S$; $037^{\circ}47'0,54''W$ e $04^{\circ}52'0,75''S$ e $037^{\circ}47'0,88''W$.

Figura 1- Localização geográfica das fazendas (A e B) de cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei*, adaptado a água doce, e do ponto do rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas, em Jaguaruana- CE.



3.1 Procedimento de coleta

Foram realizadas 15 coletas nas duas fazendas, com periodicidade quinzenal, de amostras de água, de sedimento dos viveiros e água do afluente de captação. Para as duas fazendas (A e B) foi acompanhado um ciclo do cultivo de camarões.

3.1.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos

No momento da coleta foi medida a temperatura das amostras de água com auxílio de um termômetro (INCOTERM). Em laboratório foram medidos o pH utilizando-se um potenciômetro da marca MARCONI – PA 200P e a salinidade através de um refratômetro da marca ATAGO S/MILL.

3.1.2 Amostras de água

Para a quantificação de *Escherichia coli* foi coletado 1 L de água em garrafas de vidro âmbar esterilizadas. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado no Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR/UFC, para serem processadas.

Para a coleta das amostras de água de *Salmonella* foram utilizadas garrafas de vidro âmbar esterilizadas. Cerca de 2 L da água coletada foram filtrados *in loco* usando como elemento retentor um chumaço de gaze estéril (1 metro). A gaze com o material retido era imersa em 225 mL de caldo lactosado (CL) e incubado na estufa por 24 h a 35°C.

3.1.3 Amostras de sedimento

Para a análise de sedimento foram feitas coletas em quatro pontos distintos dentro do viveiro e do afluente, aleatoriamente, em cada fazenda. Esse material foi homogeneizado formando uma amostra composta.

Para a pesquisa de *Salmonella* foram pesados 25 g do sedimento e inoculados em 225 mL de CL e incubados em estufa por 24 h a 35°C. Para a quantificação de *E.coli* as amostras foram pesadas 25 g e homogeneizadas em 225 mL de solução salina estéril 0,85% por aproximadamente 20 minutos, correspondendo a primeira diluição 10^{-1} . A partir desta foram realizadas as demais diluições (APHA, 2000).

3.2 Quantificação e identificação de *Escherichia coli*

A estimativa do número mais provável (NMP) de *E. coli* foi determinada através da técnica de fermentação em tubos múltiplos com a utilização do meio com o substrato MUG (APHA, 2000). Para as amostras de água foram utilizadas baterias de 5 tubos com o meio

modificado caldo triptose MUG (Difco) para cada diluição da amostra. Para o sedimento foram seguidas as recomendações do uso de 3 tubos (APHA, 2000).

Foram inoculadas diluições das amostras de água (10^{-1} a 10^{-3}) no meio de cultura com tubos de Durham. Para as amostras de sedimento as diluições utilizadas foram 10^{-1} a 10^{-4} . Todos os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Após este período, os tubos que apresentaram fluorescência azul quando expostos à luz ultravioleta (comprimento de onda de 365 nm) foram considerados positivos para a presença de *E. coli*.

Para o isolamento das culturas de *E. coli*, tubos positivos no caldo lauril triptose-MUG foram inoculados sobre o meio agar eosina azul de metileno (EMB - Difco). Depois de incubação a 35 °C por 18 a 24 horas, as colônias com crescimento característico de *E. coli* (brilho metálico ou centro escuro), foram selecionadas e crescidas sobre meio agar triptona soja (TSA) 35°C por 24 horas.

As cepas isoladas foram identificadas através de testes bioquímicos IMViC: Indol, vermelho de metila (VM), voges proskauer (VP) e citrato de simmons (TÔRRES *et al.*, 2004).

Os procedimentos descritos acima estão apresentados na forma de esquema nas figuras 2 e 3.

Figura 2- Fluxograma para identificação de *Escherichia coli* em amostras de água.

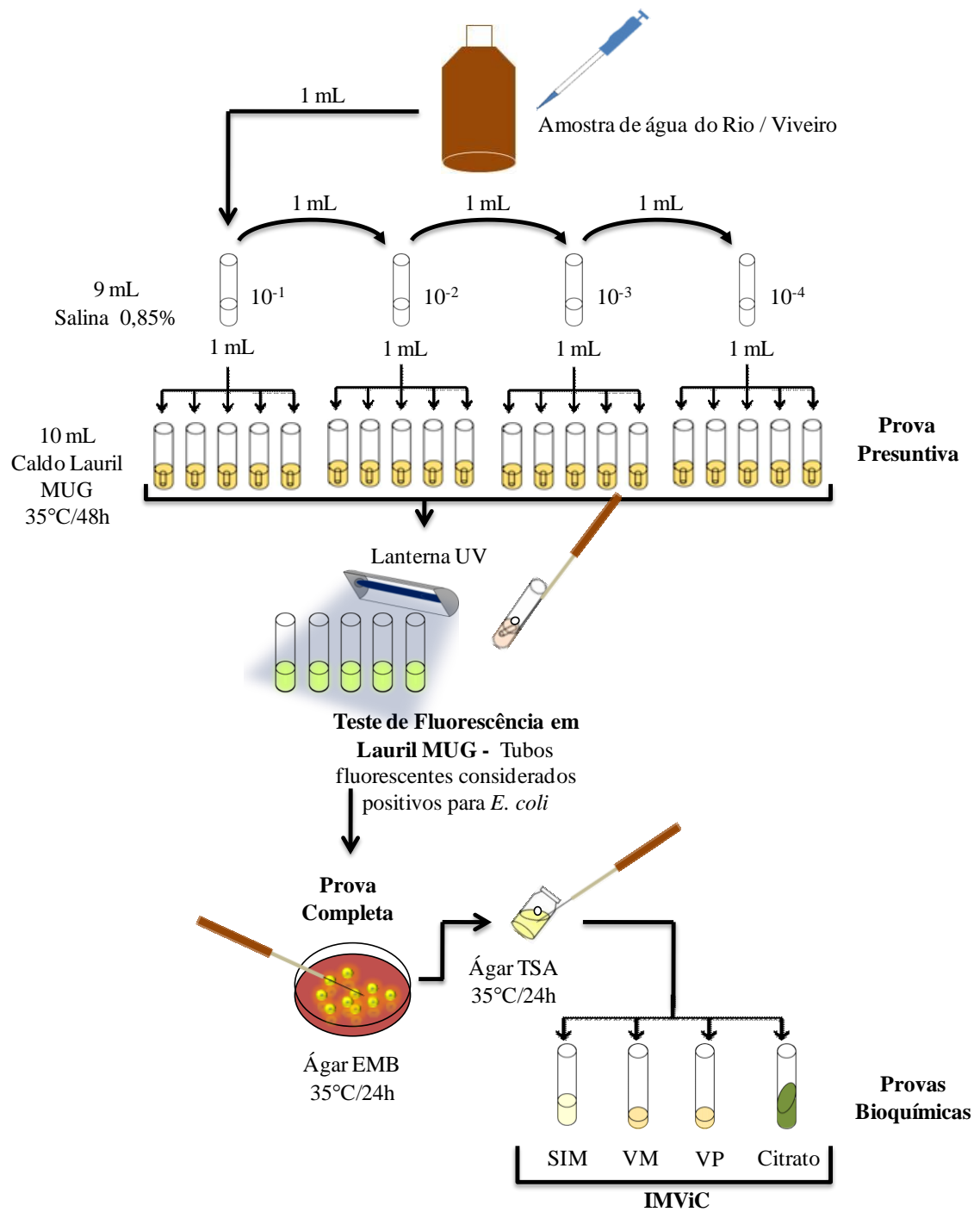
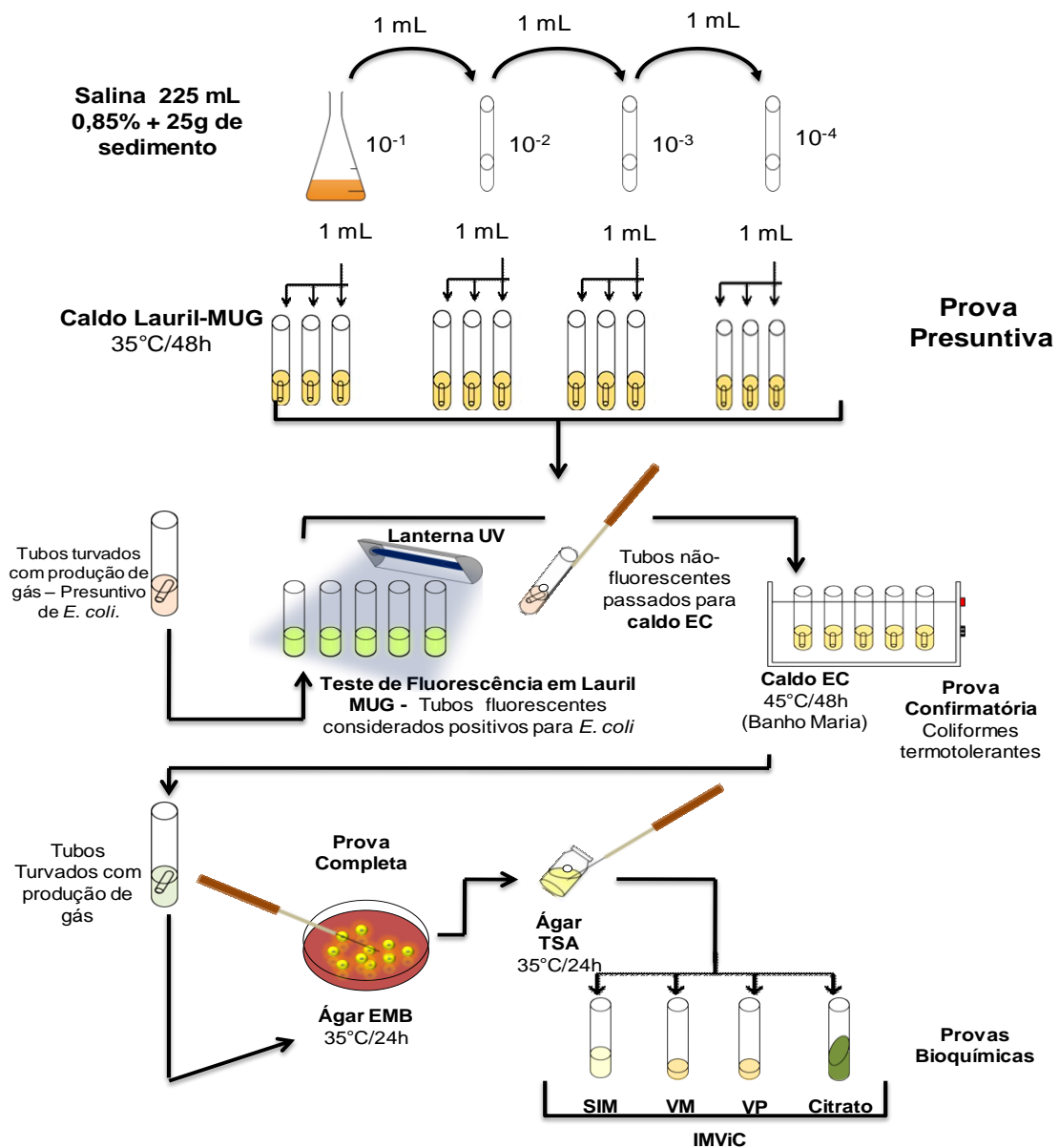


Figura 3- Fluxograma para identificação de *Escherichia coli* em amostras de sedimento.

3.3 Investigação de *Salmonella*

A investigação da presença de *Salmonella* seguiu a técnica descrita por Wallace e Hammack (2005), constando das etapas de enriquecimento (Caldo Rappaport-Vassiliadis e Caldo Tetrionato – Difco), plaqueamento diferencial (Ágar Entérico Hektoen – Difco e Ágar Verde Brillante – Difco) e triagem (Ágar Ferro-Açúcar Triplo – Difco, Ágar Lisina Ferro – Difco e Ágar Costa e Vérnin (meio de triagem)).

Os procedimentos utilizados na investigação da presença de *Salmonella* estão ilustrados nos esquemas das figuras 4 e 5.

Figura 4- Fluxograma para identificação de *Salmonella* a partir de amostras de água.

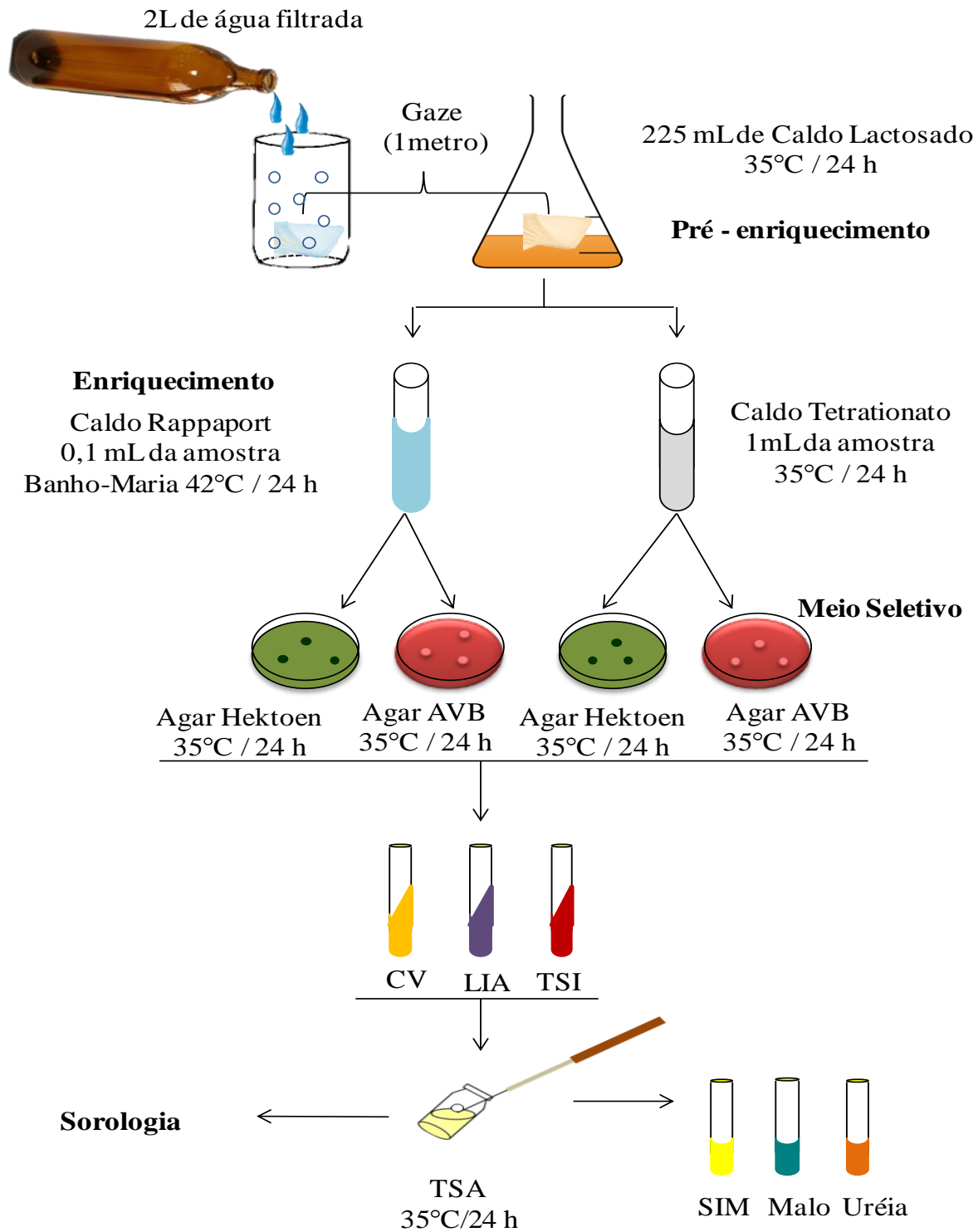
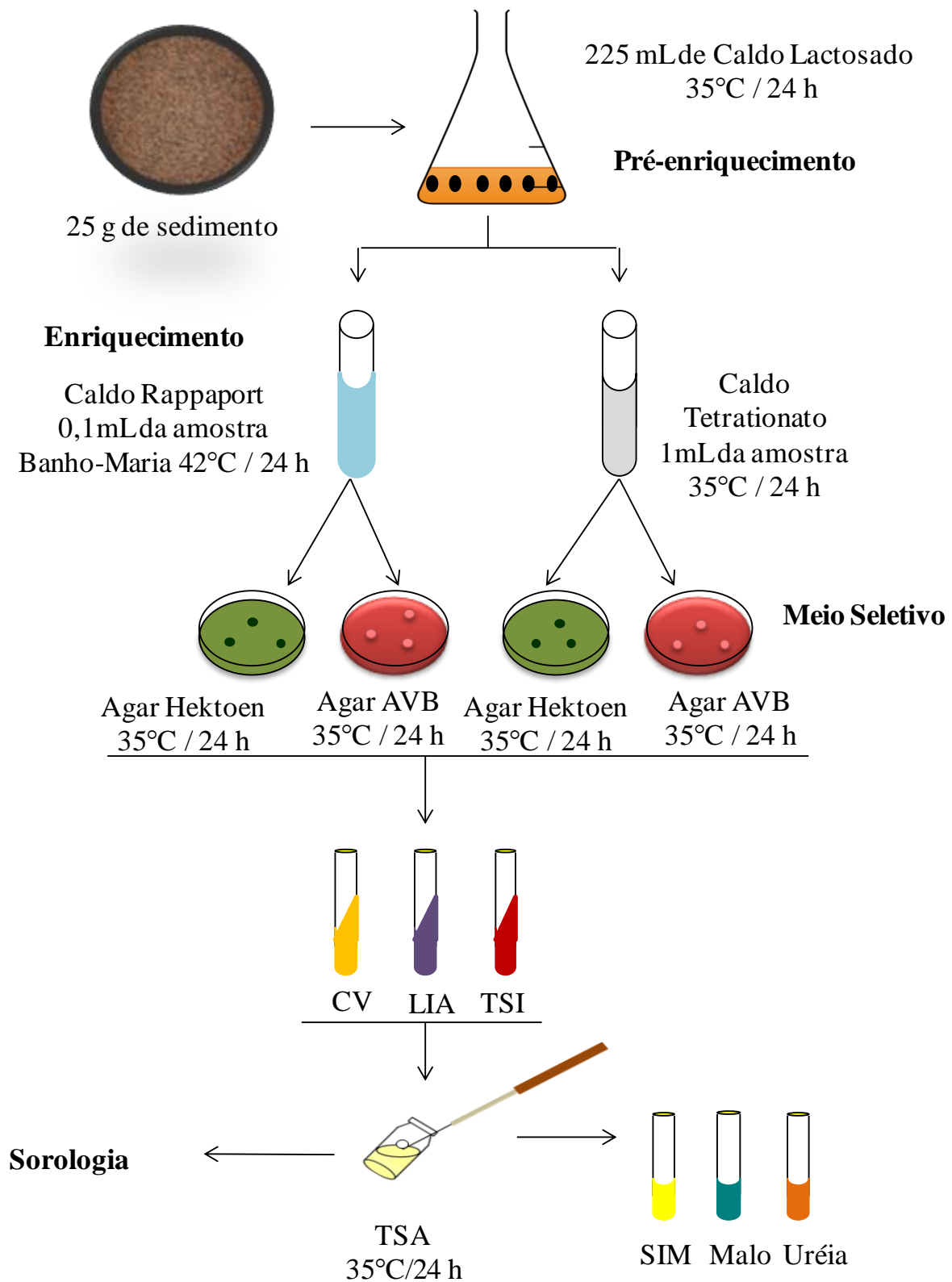


Figura 5- Fluxograma para identificação de *Salmonella* a partir de amostras de sedimento.



3.4 Sorotipagem de *Salmonella*

Colônias suspeitas foram isoladas, purificadas e submetidas a análise antigênica usando o anti-soro O:H para identificação de *Salmonella*.

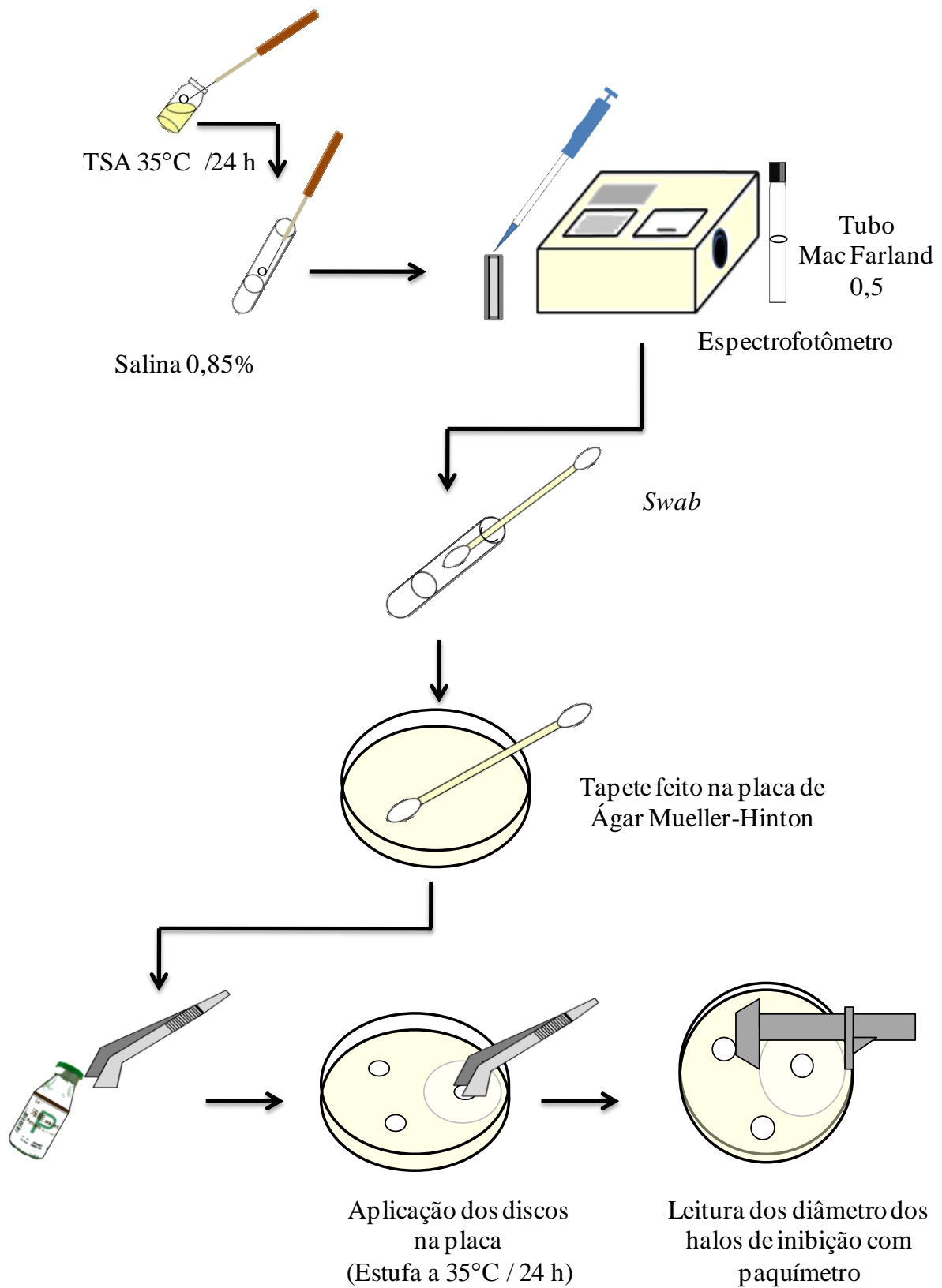
Para o teste de soroaglutinação em placa foi utilizado o soro O:H polivalente. Foi colocado 1 mL de salina 0,85% de NaCl sobre as culturas puras. Posteriormente, foram retiradas duas gotas da suspensão salina e colocadas em uma placa previamente esterilizada. Logo após, foram colocadas sobre a suspensão bacteriana duas gotas do antígeno. Homogeneizou-se por um minuto e verificou-se a presença de grumos em caixa de Huddleson, indicando a reação antígeno-anticorpo (WALLACE; HAMMACK, 2005).

As cepas que aglutinavam no anti-soro O:H polivalente foram, posteriormente, enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ-RJ, para a caracterização de sorogrupos e sorovares, segundo Le Minor & Popoff (1987).

3.5 Teste de antibiograma através do método de difusão em discos (Teste de Kirby-Bauer)

Para o antibiograma foram utilizados os seguintes discos comerciais com antimicrobianos da marca LABORCLIN pertencentes a diferentes famílias: **β -lactâmicos** – ampicilina – AMP (10 μ g); **Aminoglicosídeos** – gentamicina – GEN (10 μ g); **Cloranfenicol** – cloranfenicol – CLO (30 μ g) e florfenicol – FLF (30 μ g); **Fluoroquinolonas** – ciprofloxacina – CIP (5 μ g); **Nitrofurano** – nitrofurantoina – NIT (300 μ g); **Quinolonas** – ácido nalidíxico – NAL (30 μ g), **Tetraciclina** - tetraciclina – TET (30 μ g) e óxido de tetraciclina – OTC (30 μ g), Para preparar os discos de 30 μ g de OTC foram utilizados discos em branco fornecidos pela (LABORCLIN) impregnado com a solução antibiótica, seguindo a orientação técnica ditada pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010). O resultado foi visualizado após 24 h de incubação a 35°C (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma da técnica do antibiograma realizado com os isolados das amostras de água e sedimento coletadas nas fazendas A e B e do ponto do rio abastecedor, em Jaguaruana –CE.



3.6 Cálculo do índice de resistência (IRA) e Determinação do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MRA)

Os resultados do antibiograma foram utilizados para obtenção dos índices de resistência das cepas aos antimicrobianos testados (IRA) (JONES *et al.*, 1986) e o de múltipla resistência (MRA) (KRUMPERMAN, 1983).

$$\text{IRA} = \frac{y}{n \cdot x} \quad \text{onde:}$$

y = Total do número de resistentes

n = número de isolados

x = número de antimicrobianos testados

$$\text{MIRA} = \frac{a}{b} \quad \text{onde:}$$

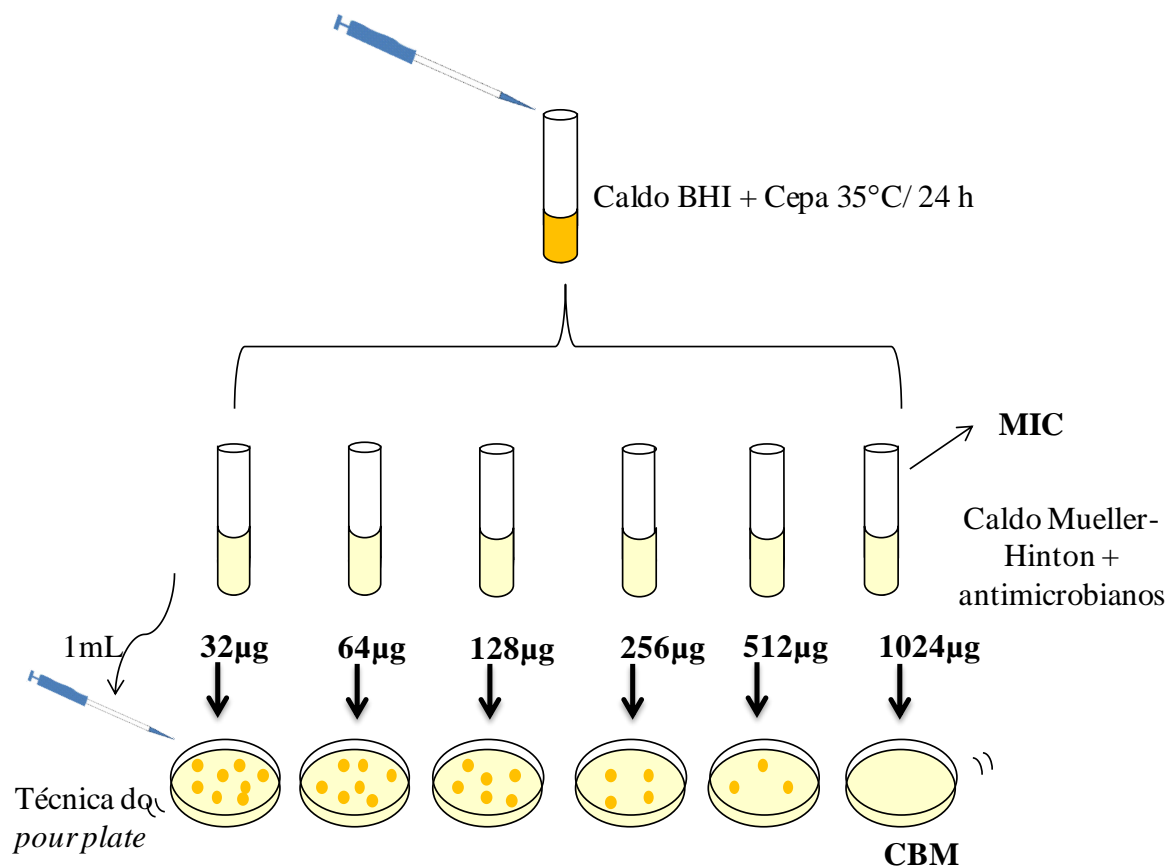
a = número de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente.

b = número de antimicrobianos aos quais os isolados foram expostos.

3.7 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Para as cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos no teste de disco-difusão (Kirby-Bauer) foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Segundo a técnica de diluição em caldo (Macrodiluição), utilizando-se caldo Mueller Hinton – Difco (CLSI, 2010).

Figura 7 – Fluxograma do procedimento da concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) realizado com os isolados de *Salmonella* e *Escherichia coli* das amostras de água e sedimento coletadas nas fazendas A e B e do ponto do rio abastecedor, Jaguaruana –CE.

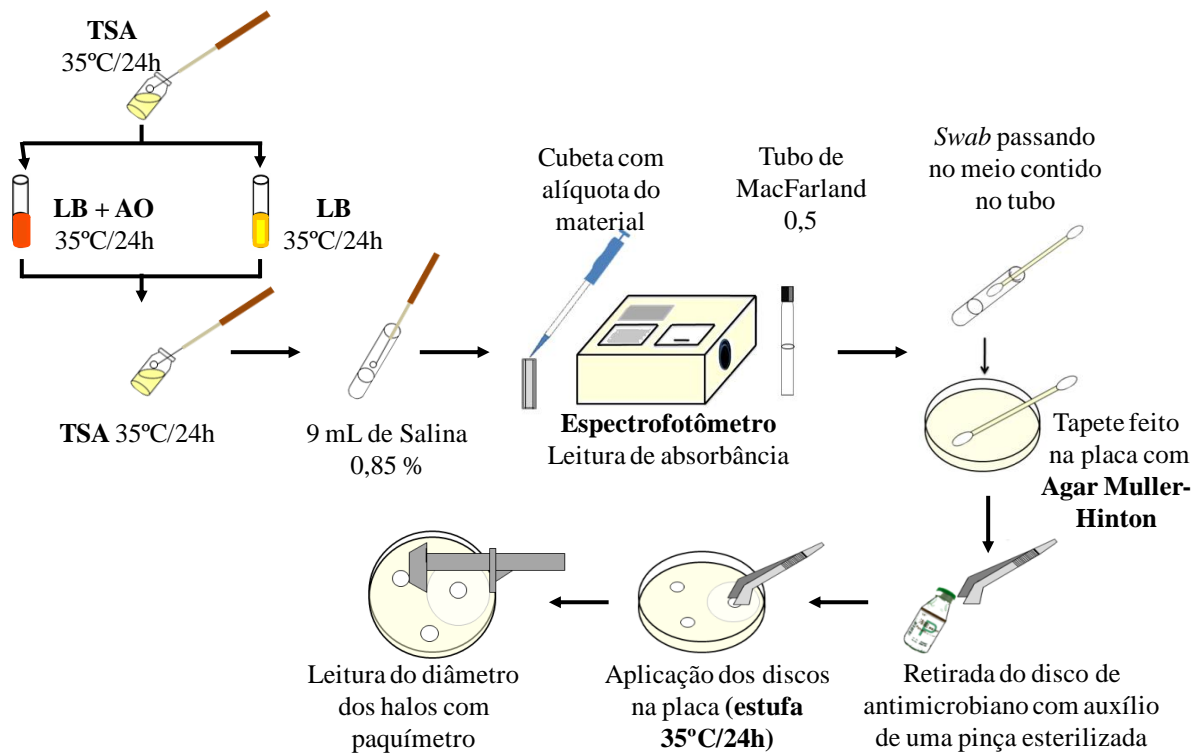


3.8 Técnica da curade plasmídeo

As cepas que apresentaram resistência a mais de um antibiótico de famílias diferentes foram submetidas à técnica de “cura” de plasmídeo de acordo com Molina-Aja *et al.* (2002) utilizando o caldo LB (Luria-Bertani – Difco) suplementado com 0,85% de NaCl e tendo como agente de cura o corante *acridine-orange* (SIGMA- A 6014) na concentração de 100 µg/mL. As cepas crescidas nesse meio durante 24 h a 35°C, sob agitação constante, foram

novamente submetidas ao teste de antibiograma frente aos antimicrobianos aos quais se mostraram resistentes (Figura 8).

Figura 8- Fluxograma do procedimento de cura plasmidial, realizado com os isolados de *Salmonella* e *E.coli* das amostras de água e sedimento coletadas nas fazendas A e B e do ponto do rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas, em Jaguaruana –CE.



3.9 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

3.9.1 Extração de DNA cromossômico das cepas de *Salmonella*

As cepas foram inoculadas em caldo infusão cérebro e coração (caldo BHI-Difco) incubadas a 35°C/24 h. Após o crescimento em BHI foram retiradas alíquotas de 1mL para iniciar o processo de extração do DNA usando-se o kit comercial DNeasy Tissue (Qiagen).

As amostras contendo o DNA amplificado foram analisadas em gel de agarose 1% (Pronadisa; CONDA). A corrida foi realizada em uma cuba horizontal de eletroforese (DIGEL; DGH12/DGH14) a 120 V/500 mA com duração de 1h em solução tampão TBE 1 X. O gel de agarose foi corado com o “RedGel” (concentração recomendada pelo fabricante) para possibilitar a visualização dos produtos amplificados no transluminador (Espectroline-UV) com luz ultravioleta. O gel foi documentado em sistema de fotodocumentação digital

Kodac EDAS290. Um marcador de tamanho molecular de 1kb (Sigma) foi usado como padrão para o tamanho molecular dos genes.

3.9.2 Condições do Box-PCR

O DNA total das culturas isoladas das amostras ambientais foi extraído de acordo com protocolo estabelecido por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A amplificação dos fragmentos dos genes 16S do DNA total (PCR) foi feita com iniciador específico BoxA1R (VERSALOVIC *et al.*, 1994) que permite estabelecer um perfil genotípico das estirpes possibilitando o agrupamento dos diferentes ecotipos bacterianos..Os iniciadores foram sintetizados pela INVITROGEN - Brasil (Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de *Salmonella*.

Genes	Sequencia dos iniciadores (5' - 3')	Ciclos	Condições de Termociclagem	Amplicons (pb) ^d	Fonte
BoxIAR	5'ctacggcaaggcgacgctgacg3'	1	95°C/2s	400 a 2500	Versalovic <i>et al.</i> , (1994)
		30	94°C/3s		
			92°C/30s		
			50°C/1min		
			65°C/8min		
1	65°C/8min	Albufera <i>et al.</i> , 2009			

Em todas as amplificações foi utilizada como controle uma cepa de referência: *Salmonella* sor. Enteritidis IOC. O DNA total extraído foi amplificado por Box-PCR em termociclador -Techne (Tabela 2).

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

Reagentes da Reação ¹	Box PCR
Tampão 10x	20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl
dNTP's (2,5 mM)	0,25µM
Iniciador F (99.300 pM)	200 pM
Iniciador R (99.300 pM)	200 pM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5µM
Taq polimerase (500 U)	4 U
Vol. da reação	25 µL

As amostras contendo o DNA amplificado foram analisadas em gel de agarose 2% (Pronadisa; CONDA). A corrida foi realizada em uma cuba horizontal de eletroforese (DIGEL; DGH12/DGH14) a 120 V/500 mA com duração de 5 h em solução tampão TBE 1 X. O gel de agarose foi corado com o "RedGel" (concentração recomendada pelo fabricante) para possibilitar a visualização dos produtos amplificados no transluminador (Espectroline-UV) com luz ultravioleta. O gel foi documentado em sistema de fotodocumentação digital Kodac EDAS290. Um marcador de tamanho molecular de 2 kb (Sigma) foi usado como padrão para o tamanho molecular dos genes.

3.9.3 Condições da PCR para detecção dos genes de virulência

Para a detecção da virulência de *Salmonella* foram utilizados os *pefA* (virulência do plasmídeo codificado pela fímbria) *invA* (patogenicidade) e *spvC* (virulência plasmidial). Os *primers* foram confeccionados pela INVITROGEN- BRASIL (Tabela 3).

Tabela 3: Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras de *Salmonella*

Genes	Sequencia dos iniciadores (5' - 3')	Amplicons (pb) ^d	Ciclos	Condições de Termociclagem	Fonte	
<i>pefA</i>	F: 5'gcccgcctcagccgaaccag3'	157	1	94°C/3min.	Trafny <i>et al.</i> , (2006)	
	R: 5'gcagcagaagcccaggaaacagtg3'		30	94°C/1min.		
<i>invA</i>	F: 5'acagtgctcgtttacgacctgaat3'	244		30		58°C/1min.
	R: 5'agacgactggactgatcgataat3'					72°C/1min.
<i>spvC</i>	F: 5'actccttgcaacaacaaatgcgga3'	571		1		72°C/5min.
	R: 5'tgtcttctgcatttcgccaccatca3'					

Em todas as ampliações foi utilizada como controle uma estirpe de referência: *Salmonella* Enteritidis IOC. O DNA total extraído foi amplificado por Multiplex-PCR em termociclador - Techne (Tabela 4).

Tabela 4 Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para detectar genes de virulência nas estirpes de *Salmonella*.

Reagentes da Reação ¹	PCR (multiplex)		
	<i>Genes de virulência</i>		
	<i>pefA</i>	<i>invA</i>	<i>spvC</i>
Tampão 10x	1x	1x	1x
dNTP's (2,5 mM)	0,25µM	0,25µM	0,25µM
<i>Iniciador F</i> (91.000 ρM)	200 ρM	200 ρM	200 ρM
<i>Iniciador R</i> (91.000 ρM)	200 ρM	200 ρM	200 ρM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5µM	1,5µM	1,5µM
Taq polimerase (500 U)	4 U	4 U	4 U
Vol. da reação	25 µL	25 µL	25 µL

As amostras contendo o DNA amplificado foram analisadas em gel de agarose 1,5% (Pronadisa; CONDA). A corrida foi realizada em uma cuba horizontal de eletroforese (DIGEL; DGH12/DGH14) a 120 V/500 mA com duração de 1 hora e 20 minutos em solução tampão TBE 1 X. O gel de agarose foi corado com o "Gel Red" (concentração recomendada pelo fabricante) para possibilitar a visualização dos produtos amplificados no transluminador (Espectroline-UV) com luz ultravioleta. Os géis foram documentados em sistema de fotodocumentação digital Kodac EDAS290. Um marcador de tamanho molecular de 1 kb (Sigma) foi usado como padrão para comparação do tamanho molecular dos genes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos das amostras ambientais das fazendas A e B

Os resultados dos parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) das águas nas áreas de cultivo de camarão estão apresentados na Tabela 5. Observa-se pouca variação entre os parâmetros ambientais da água nas áreas pesquisadas (viveiro e o Rio Jaguaribe) nas duas fazendas.

Tabela-5 Parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) das amostras de água de um viveiro de cultivo e do Rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas A e B.

Coletas	Fazenda A				Fazenda B			
	Temperatura (°C)		pH		Temperatura (°C)		pH	
	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio
1	29,3	30	9,02	8,72	30	29	9,39	8,27
2	27,1	28	8,83	8,67	29	28	8,20	9,61
3	29	28	8,59	8,48	29	29	9,35	8,13
4	27	28	8,91	8,48	34	33	8,49	8,01
5	27	29	8,39	8,69	28,5	30	8,98	8,19
6	32	32	8,98	8,60	35	37	8,70	8,30
7	-	30	-	9,0	31	31	9,35	8,89
8	31	29	9,30	9,15	32	32	8,80	8,42
9	30	29	7,63	9,05	-	29	-	8,08
10	28	29	9,14	9,17	32	31	7,95	8,14
11	27	28	8,24	7,66	28	27	9,40	8,75
12	29	28	8,51	8,31	28	29	8,61	8,16
13	29	28	8,44	8,30	31	30	8,42	8,33
14	30	30	7,63	8,05	30	30	8,05	8,21
15	29	29	8,85	8,50	31	31	8,50	8,08

- Não houve coleta.

As temperaturas registradas nas amostras de água dos viveiros e no rio Jaguaribe, abastecedor da Fazenda A oscilaram entre 27,1 e 32 °C e de 28 a 32°C, respectivamente. Valores ligeiramente superiores foram observados nas amostras de água coletadas na fazenda B (viveiro e Rio Jaguaribe): 28,5 a 35,0 °C e 27,0 a 37,0°C. As temperaturas médias das águas

dos viveiros ficaram abaixo, aproximadamente, 1°C das oriundas do corpo d'água abastecedor, um efeito relacionado à hidrodinâmica dos dois ambientes. Essas temperaturas são ideais para o cultivo de organismos aquáticos tropicais (LIMA, 2007), além de estarem dentro do intervalo ótimo para a multiplicação de bactérias mesófilas (ALTERTHUM, 2008).

De modo geral, o pH das águas apresentou-se alcalino em todas as coletas, variando de 7,63 a 9,30 e de 7,95 a 9,40 dentro dos viveiros (fazenda A e B) e de 7,66 a 9,17 e de 8,01 a 9,61 nos canais de abastecimento das respectivas fazendas.

Hernandez e Nunes (2001) ressaltam que a faixa ideal do pH para cultivo de *L. vannamei* varia entre 8,1 e 9,0.

Para salinidade, no decorrer das coletas, foram observados valores abaixo de 0,5 para a maioria das amostras (13,3%). Apenas duas amostras apresentaram salinidade de 5 e 6 nas amostras de água dos viveiros e nas águas do rio. Estas variações podem ser resultado da elevada taxa de evaporação na região (temperaturas altas) com prolongado período sem precipitação pluviométrica.

Abraham *et al.* (2004) também mediram temperatura, pH e salinidade nas águas de abastecimento e descarte de fazendas de camarão controladas por fatores ambientais tais como: radiação solar, temperatura relativa do ar e chuvas. Enquanto os dois primeiros fatores promovem o aquecimento da água durante o dia, provocando a evaporação e um aumento nos valores da salinidade, as precipitações pluviométricas reduzem temperatura, pH e salinidade na água.

4.2 Quantificação de *Escherichia coli* em amostras ambientais de viveiro de cultivo e do Rio Jaguaribe

O NMP de *E. coli* das amostras de água do viveiro da fazenda A e do rio Jaguaribe variou entre <1,8 e 33x10 e de <1,8 a 33x10 respectivamente, enquanto que, para o sedimento do viveiro e do rio essa quantificação variou de <3,0 a 23,0 para os dois tipos de amostra. Na fazenda B os valores do NMP de *E. coli* para as amostras de água do viveiro e da água do rio oscilaram de <1,8 a 130x10³ e de <1,8 a 110x10, respectivamente. Com relação ao sedimento do viveiro foram observadas oscilações no NMP de *E. coli* de <3,0 a 460x10 e do rio de <3,0 a 75 (Tabela 6).

A presença de coliformes está relacionada a uma maior concentração de matéria orgânica, o que permite afirmar que os viveiros estão recebendo aporte de nutrientes o que favorece a proliferação de coliformes na coluna d'água (VIEIRA *et al.*, 2001). Barcina, Lebaron e Vives-Rego (1997) afirmam que bactérias alóctones e vários outros

microrganismos entéricos, presentes no ambiente, estão diretamente relacionados com a descarga de resíduos para os rios e áreas costeiras. O grupo coliforme é um indicador de contaminação fecal mais frequentemente utilizado, sendo empregado desde o século XIX como parâmetro bacteriológico básico na definição de padrões, caracterização e avaliação da qualidade das águas (VASCONCELOS *et al.*, 2006). Essa qualidade é testada através da investigação da presença de coliformes termotolerantes, dos quais a *Escherichia coli* representa cerca de 70% do total sendo, portanto, considerada a principal representante (TÔRRES, 2004).

O valor máximo permitido para coliformes na Resolução N^o 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) para águas doces, pertencentes à Classe 1 é de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80%, ou mais, de pelo menos seis amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *Escherichia coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente. De acordo com a Portaria N^o 154 da Secretaria do Meio Ambiente do Ceará (SEMACE, 2002) é exigida na instalação de uma fazenda de carcinicultura, uma análise da fonte abastecedora do local. A Portaria exige que as águas sejam bacteriologicamente adequadas à instalação de uma fazenda de carcinicultura e que contenham coliformes termotolerantes em quantidades inferiores a 1.000/100 mL.

As maiores ocorrências de *Escherichia coli* foram encontradas na água do viveiro da fazenda A e no sedimento do viveiro da fazenda B (Tabela 6)

De um modo geral, os valores de NMP de *E. coli* nas duas fazendas foram baixos. Isso se deve ao sistema de recirculação parcial utilizado nas fazendas. Poucas exceções aconteceram (amostras 4 e 13, das águas e sedimento do viveiro da fazenda B). Para que estas amostras tenham apresentado valores tão discrepantes é possível que tenha acontecido alguma condição especial. Mas, se fosse considerado esse parâmetro da água e sedimento do viveiro, 13% das amostras estariam fora dos padrões exigidos para o cultivo de organismos aquáticos.

Uma das prováveis causas do aparecimento de *E. coli* em sedimento dos tanques de cultivo nas fazendas de camarão é a utilização de rações no cultivo e fertilizantes tal como esterco de aves (BHASKAR *et al.*, 1995). Este argumento, entretanto, não é aplicável para a maioria das fazendas brasileiras de cultivo de camarão uma vez que a utilização de fertilizantes de origem animal não é rotina.

Tabela 6 – Número Mais Provável (NMP/100 mL ou NMP/g) de *Escherichia coli* e indicação das amostras nas quais foram isoladas *Salmonella*.

NMP de <i>Escherichia coli</i>								
Coletas	Fazenda A				Fazenda B			
	Água		Sedimento		Água		Sedimento	
	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio	Viveiro	Rio
1	2x10 ²	<1,8	<3,0	<3,0	<1,8	2x10 ²	3,6	<3,0
2	2x10 ² *	1,8x10 ²	9,2	3,0	7,8x10 ²	2x10 ²	9,2	23*
3	7,8x10	4,5x10*	3,6	<3,0	33x10	22x10	3,0	9,2
4	14x10	11x10	23	3,6	130x10 ³	110x10	43	23
5	7,8x10	33x10	15	<3,0	4,5x10*	13x10*	43	23
6	11x10	33x10	3,6	3,6	11x10	23x10	7,4	75
7	-	11x10	3,6	<3,0	6,8x10	6,8x10*	<3,0	<3,0*
8	33x10	7,8x10	23	23	7,8x10	2x10	11x10	<3,0
9	2x10	4,5x10	3,6	9,2	-	11x10	3,6	9,2
10	2x10	21x10	<3,0	<3,0	11x10	4,5x10	15	<3,0
11	2x10	11x10	<3,0	3,6	2x10	23x10	3,6	<3,0*
12	2x10	13x10	<3,0	<3,0	2x10	6,8x10	23	<3,0*
13	<1,8	<1,8	<3,0	<3,0	4,5x10	<1,8	460x10	<3,0
14	<1,8	4,5x10	<3,0	<3,0	13x10	2x10	3,6	<3,0
15	<1,8	<1,8	<3,0	<3,0	2x10	11x10	93	3,6*

- não houve coleta; * amostras com isolamento de *Salmonella*.

Menezes (2011), estudando a colimetria em quatro estuários do Ceará associados à atividade de carcinicultura, verificou que nenhum dos valores de coliformes termotolerantes mencionados excedeu o limite proposto pela legislação vigente, corroborando com os resultados para *Escherichia coli* encontrados na presente pesquisa.

Em pesquisa realizada por Bhaskar *et al.* (1995) em fazendas de camarão, na Índia, as amostras de água dos viveiros de cultivo apresentaram contagens de CT, CF e EC de 1,6, 0,23 e 0,03/mL, respectivamente. Na presente pesquisa, os resultados encontrados foram superiores àqueles obtidos pelos autores anteriormente citados. Segundo eles, o baixo nível de coliformes encontrados nas amostras de água pode ser atribuído ao fato de que nas fazendas de cultivo de camarão, normalmente, ocorrem trocas contínuas da água.

A legislação vigente não estabelece limites para bactérias indicadoras de contaminação no sedimento de ambientes aquáticos. Entretanto, já foi estabelecida a potencial influência da presença de bactérias fecais no sedimento sobre os níveis dessas bactérias na coluna d'água e a relação entre a carga bacteriana, o sedimento e a coluna d'água. Gerba e Mcleod (1976) afirmam que os coliformes totais, coliformes fecais e *Salmonella* tendem a se concentrar mais no sedimento do que em águas superficiais poluídas. Outros autores ressaltam que a quantidade de *Salmonella*, coliformes totais, coliformes termotolerantes e enterococos encontrados no sedimento é bem menor do que na coluna d'água (CRUMP; ARMBRUST; BAROSS, 1999; BERTHE, *et al.*, 2008).

Brands *et al.* (2005) estudando a prevalência de *Salmonella* spp. em ostras coletadas na Costa Oeste, Leste e na Costa do Golfo, nos Estados Unidos, não encontraram uma relação do NMP de coliformes termotolerantes com o número de isolados de *Salmonella*. Da mesma forma, Dalsgaard *et al.* (1995) apesar de terem detectado altos índices de coliformes totais e termotolerantes em dezesseis fazendas de cultivo de peneídeos localizadas na Tailândia, não confirmaram *Salmonella* em nenhuma amostra de água, sedimento e camarão coletada.

Constata-se, ao analisar os níveis de bactérias fecais e a frequência de isolamento de *Salmonella* nas amostras, que, a presença dessa bactéria não esteve linearmente correlacionada com a densidade estimada de *E. coli*. Essa correlação fraca entre os parâmetros foi comprovada através da aplicação de um teste de coeficiente de correlação (Pearson) entre os valores de NMP de *E. coli* nas amostras ambientais e o correspondente isolamento de *Salmonella*. Os coeficientes obtidos foram: $r = 0,27$ (*E. coli* água x sedimento), $r = 0,06$ (*E. coli* x *Salmonella* na água) e $r = -0,08$ (*E. coli* x *Salmonella* no sedimento).

Bhaskar *et al.* (1998) observaram uma baixa correlação entre o número de organismos indicadores (coliformes) e a incidência de *Salmonella*, *Vibrio* e *Listeria monocytogenes* ao estudarem camarão cultivado. Por outro lado, Martins *et al.* (1988) relataram que, ao examinar amostras de água doce verificaram uma relação praticamente linear entre o isolamento de salmonelas e dos NMP de CT e CF.

Das 265 cepas suspeitas de *E. coli*, 50 (18,9%) foram confirmadas. O baixo isolamento pode estar relacionado com a utilização do Lauril-MUG como meio seletivo para *E. coli* (SCHETS; MEDEMA; HAVELAAR, 1993; GRIFFITH *et al.*, 2006).

Parente *et al.* (2011) trabalhando com bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil, encontraram resultados semelhantes aos da presente pesquisa.

Visando avaliar a relação entre a estimativa do número de *E. coli* nas amostras ambientais e o isolamento de *Salmonella* foi estabelecido o valor de 10 NMP/100 mL para *E. coli* como limite para comparação entre as frequências de isolamento de *Salmonella* das mesmas amostras (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre a presença de *Salmonella*, sorovares predominantes e o isolamento de *E.coli* (NMP \geq 10), nas amostras de água das duas áreas de cultivo de camarão marinho aclimatado.

Fontes	<i>E.coli</i> (NMP \geq 10)		<i>Salmonella</i>		Sorovares de <i>Salmonella</i>	
	A	S	A	S	A	S
Fazenda A						
Viveiro	11	0	1	4	3	0
Rio	12	0	1	2	3	0
Fazenda B						
Viveiro	13	0	1	7	3	0
Rio	14	5	2	6	6	15

A: água, S: sedimento.

Não houve relação entre o número de *E. coli* e o isolamento de sorovares de *Salmonella* nas amostras ambientais. A maioria das amostras de água apresentou valores estimados de *E. coli* maiores que 10/100 mL, e o isolamento de *Salmonella* foi relativamente baixo. Nas amostras de sedimento todos os valores de *E. coli* ficaram abaixo de 10/g e os isolamentos de *Salmonella* foram mais frequentes.

A presença de *Salmonella* em sedimentos já foi descrita por Carvalho *et al.* (2009) em duas fazendas de cultivo no litoral leste e oeste de Fortaleza, Ceará. Parente *et al.* (2011) e Figueirêdo (2008) também encontraram *Salmonella* em amostras de água e de camarão no litoral leste e oeste de Fortaleza, Ceará.

Ainda neste sentido, alguns autores pesquisaram *Salmonella* em outras fontes ambientais estuarinas. Farias *et al.* (2010) detectaram essa bactéria em amostras do molusco bivalve *Tagelus plebeius* coletadas no estuário do rio Ceará. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al.* (2003) ao investigar *Salmonella* em ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* no estuário do rio Cocó em Fortaleza, Ceará.

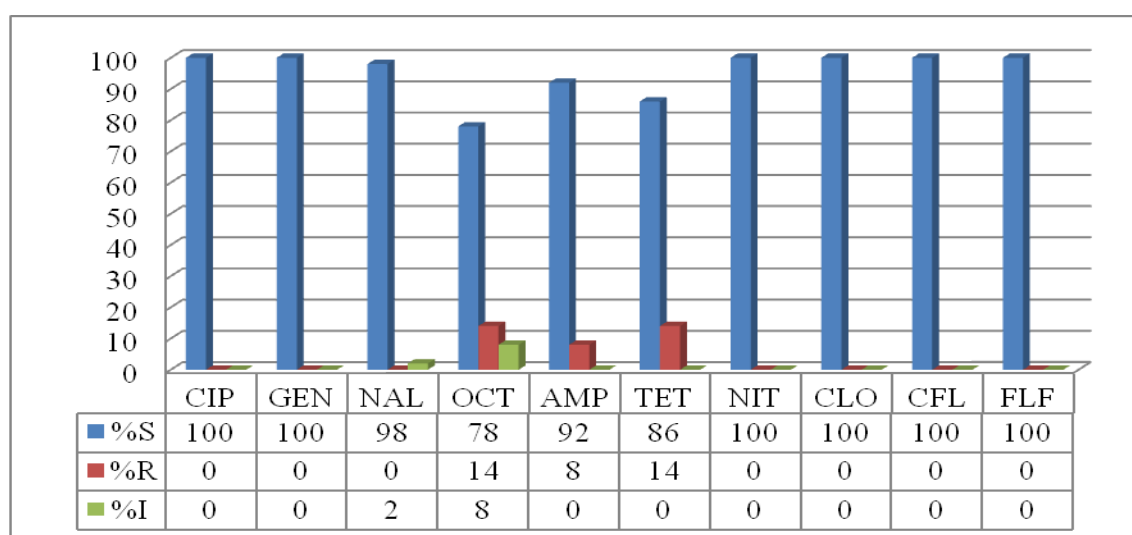
A presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* em alimentos destinados ao consumo humano pode estar relacionada às más condições higiênico-sanitárias em alguma etapa do processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003; WEBSTER *et al.*, 2004). Entretanto, a aplicação das boas práticas de manipulação e de armazenamentoseria a melhor

conduta para controlar a qualidade do produto retardando as reações bioquímicas e a atividade microbiana indesejáveis (BEATO, 2002).

4.3 Suscetibilidade das cepas de *Escherichia coli* aos antimicrobianos

Os resultados referentes ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas de amostras ambientais estão dispostos no Gráfico 1. Pode-se observar que *E. coli* apresentou resistência aos antimicrobianos AMP (8%), OTC (14%) e a TET (14%) entre os dez testados.

Gráfico 1 - Percentual de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de 50 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas A e B.



CIP-ciprofloxacina; GEN-gentamicina; NAL-ácido nalidíxico; OTC-oxitetraciclina; AMP-ampicilina; TET-tetraciclina; NIT-nitrofurantoina; CLO-cloranfenicol; CFL-cefalotina; FLF-florfenicol. S-sensível; R-Resistente; I-Intermediário.

Tao *et al.* (2010) analisando resistência a antimicrobianos e genes de resistência a tetraciclina em espécies bacterianas da família das Enterobacteriaceae, isoladas do rio Pérola, no sul da China, encontraram resistência em 100% os isolados nos diferentes locais de coleta das amostras, sendo: de 11 a 100% para a ampicilina, de 0 a 62% para trimetoprim – sulfametoxazol, de 0 a 62% para trimetoprim, de 0 a 58% para tetraciclina de 0 a 43% para cloranfenicol, de 0 a 25% para ciprofloxacina, e de 0 a 21% para levofloxacina.

Vieira *et al.* (2010) pesquisando a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *E. coli* isoladas de camarão e de ambientes de carcinicultura encontraram 33% dos isolados resistentes a tetraciclina. O percentual de bactérias resistentes detectado pelos autores foi mais alto do que os encontrados nesta pesquisa.

Schlusener e Bester (2006) ressaltam que os antimicrobianos não são absorvidos em sua totalidade pelos humanos e animais, sendo excretados de forma inalterada nas fezes e urina para o ambiente através de esgoto, hospital, águas residuais e resíduos de animais. Esse uso difundido de antimicrobianos na medicina e na criação de animais foi um fator importante para o surgimento da resistência (MCDONALD *et al.*, 1987; WITTE, 1998; ADAM, 2002; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

No teste de antibiograma foi observada resistência em dezesseis (32%) isolados. Após a cura dos plasmídeos foi verificado que a maioria das cepas possuía o fenótipo de origem plasmidial, isto é, a resistência foi perdida após a exposição a um agente curagênico. Apenas quatro cepas, duas isoladas do sedimento do viveiro da fazenda A (E4 e E5) e outras duas do sedimento do rio da fazenda B (E23 e E24), não perderam a resistência à TET após a cura, o que caracteriza um genótipo, provavelmente, de origem cromossômica ou relacionada a elementos genéticos móveis inseridos no cromossomo (Tabela 8).

A presença de bactérias ambientais com perfis de multirresistência é preocupante, uma vez que, a presença de plasmídeos- R colabora na transmissão e disseminação da resistência entre bactérias patogênicas (ZULKIFLI *et al.*, 2009), o que não é muito discutido e nem conhecido pelos carcinicultores. Os efeitos da resistência antimicrobiana para o ecossistema aquático permanecem desconhecidos (CRANE; WATTS; BOUCARD, 2006). Um conceito que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz a resistência e sim atua como um selecionador dos microrganismos mais resistentes em numa população bacteriana (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O comportamento de cepas com resistência intermediária é um fator que chama a atenção. No presente estudo, seis cepas (37,5%) apresentaram resistência intermediária. Krempels (2006) relata que esse é o perfil de organismos sensíveis, mas, potencialmente, resistentes. Existem membros da população bacteriana imunes aos efeitos dos fármacos utilizados e outras que são sensíveis.

Van Essen-Zandbergen *et al.* (2007) ressaltam que genes de resistência a antimicrobianos encontrados em isolados de *Escherichia coli* podem ser horizontalmente transferidos para agentes patogênicos, tais como *Salmonella*, representando um risco para a saúde pública.

Tabela 8- Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre as cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras ambientais dos viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.

Origem	Fonte	Amostra	Isolados	Perfil de resistência			
				Antes cura		Depois cura	
				R	I	R	
Fazenda A	Viveiro	Água	E 34	TET	-	-	
		Sedimento	E 4	OTC, TET	-	OTC,TET	
			E 5	OTC, TET	-	TET	
	Rio	Água	E 6	AMP	-	-	
			E 7	AMP	-	-	
	Fazenda B	Viveiro	Água	E 16	AMP, OTC, TET	NAL	-
				E 17	OTC, TET	-	-
E 18				AMP	-	-	
E 62				-	OTC	-	
E 63				-	OTC	-	
Rio		Sedimento	E 64	-	OTC	-	
			E 59	OTC	-	-	
			Água	E 60	-	OTC	-
				E 61	-	OTC	-
			Sedimento	E 23	OTC, TET	-	TET
E 24	OTC, TET	-	TET				

R- resistente;I- intermediário.

Os valores de CIM e CBM para as cepas E5 e E6 da fazenda A foram de 32 $\mu\text{g/mL}$ e de $> 128 \mu\text{g/mL}$, respectivamente para TET e para OTC. Foram observados os mesmos valores de CIM e CBM para TET e OTC para as cepas E23, E60 e E62 da fazenda B (Tabela 9).

Valores elevados de CIM para antimicrobianos com uso rotineiro como promotores de crescimento em animais terrestres e aquáticos têm sido citados na literatura. Por exemplo, um estudo conduzido por Baccaro *et al.* (2002) com amostras de *E. coli* isoladas de fezes de leitões, provenientes de 12 granjas da região sudoeste do Estado de São Paulo, revelou um CIM para oxitetraciclina $>32 \text{ mg/L}$, diferente daquele encontrado nas amostras ambientais de *E.coli* (Tabela 9).

Da mesma forma, Pereira Júnior *et al.* (2006) ao avaliarem o perfil de sensibilidade de cepas de *Aeromonas hydrophila*, oriundas de pescados de diferentes localidades de cultivo, encontraram resistência à OTC com valores de CIM entre 100 e 800 mg/L. Outros autores também constataram um alto nível de resistência a TET (>256 µg/mL) para cinco de 33 cepas de *E. coli* isoladas do solo de fazenda de gado leiteiro (JONES *et al.*, 2011).

Tabela 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de antibióticos contra bactérias *Escherichia coli* isoladas de amostras ambientais de viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas

Localização	Amostras	Cepas	Concentração dos antimicrobianos (µg/mL)			
			TET		OTC	
			CIM	CBM	CIM	CBM
Fazenda A	Sedimento do viveiro	E5	32	>128	32	>128
		E6	32	>128	32	>128
Fazenda B	Sedimento do rio	E23	128	>128	128	>128
		E60	128	>128	128	>128
	Água do viveiro	E62	128	>128	128	>128

4.4 Detecção de estirpes de *Salmonella* spp. em amostras ambientais de viveiro de cultivo e do rio abastecedor das fazendas A e B

Das 186 estirpes suspeitas de *Salmonella* spp. 30 (16,13%) foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Salmonella*, resultando na identificação de cinco diferentes sorovares: *S. sor. Saintpaul* (3), *S. sor. Infantis* (6), *S. sor. Panama* (3), *S. sor. Madelia* (6), *S. sor. Braenderup* (5), *S. enterica* subsp. *houtenae* (6) e *S. enterica* subsp. *enterica* (2) (Tabela 10).

Ribeiro *et al.* (2010) ao analisarem amostras de peixes provenientes da estação de aquicultura na cidade do Rio de Janeiro encontraram os seguintes sorovares (*S. sor. Infantis*, *S. sor. Madelia* e *S. sor. Saintpaul*), corroborando com os resultados desta pesquisa. Diferentemente, Farias *et al.* (2010) trabalhando com amostras de molusco bilvave *Tagelus plebeius*, coletadas no estuário do rio Ceará, identificaram: *S. sor. Bredeney*, *S. sor. London* e *S. sor. Muenchen*.

A maior frequência de *Salmonella* ocorreu na Fazenda B com 24 isolados (Tabela 10), representando 80% do total de estirpes identificadas.

Tabela 10 – Estirpes de *Salmonella* spp. detectadas em amostras de água e sedimento de viveiros das fazendas A e B e do Rio Jaguaribe, abastecedor das fazendas.

Origem	Fonte	Amostra	Cepas	Sorovares identificados
Fazenda A	Viveiro	Água	Sa1	<i>S. sor. Saintpaul</i>
		Sedimento	-	-
	Rio	Água	Sa2	<i>S. sor. Saintpaul</i>
			Sa3	<i>S. sor. Madelia</i>
			Sa4	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>
			Sa5	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>
			Sa6	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>
			Sedimento	-
	Viveiro	Água	Sa8	<i>S. sor. Infantis</i>
			Sa9	<i>S. sor. Panama</i>
Sa10			<i>S. sor. Infantis</i>	
Sedimento		-	-	
Fazenda B	Rio	Água	Sa11	<i>S. sor. Panama</i>
			Sa12	<i>S. sor. Panama</i>
			Sa13	<i>S. sor. Madelia</i>
			Sa14	<i>S. sor. Madelia</i>
			Sa15	<i>S. sor. Madelia</i>
			Sa16	<i>S. sor. Madelia</i>
	Sedimento	Ss17	<i>S. sor. Braenderup</i>	
		Ss18	<i>S. sor. Braenderup</i>	
		Ss19	<i>S. sor. Braenderup</i>	
		Ss20	<i>S. sor. Braenderup</i>	
		Ss21	<i>S. sor. Braenderup</i>	
		Ss22	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Entérica</i>	
		Ss23	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Entérica</i>	
		Ss24	<i>S. sor. Infantis</i>	
		Ss25	<i>S. sor. Infantis</i>	
		Ss26	<i>S. sor. Infantis</i>	
Ss27	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>			
Ss28	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>			
Ss29	<i>S. sor. Infantis</i>			
Ss30	<i>S. sor. Madelia</i>			
Ss31	<i>S. sor. Madelia</i>			

Corroborando com a presente investigação, salienta-se a detecção de *Salmonella* em ambientes de fazendas de cultivo em áreas costeiras e em águas dos rios da Região Nordeste (CARVALHO *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PARENTE *et al.*, 2011). Sua presença está relacionada, provavelmente, a despejos de efluentes sanitários sem tratamento, em corpos aquáticos.

Em pesquisa realizada por Carvalho *et al.* (2009) foram detectadas cepas de *Salmonella* na água, sedimento e camarão em duas fazendas de cultivo no litoral leste e oeste de Fortaleza, Ceará. A presença deste patógeno em áreas de cultivo e nos organismos cultivados é de interesse para a saúde pública, uma vez que a legislação impõe ausência em 25 g de amostra de qualquer alimento (BRASIL, 2001) e a bactéria, uma vez na água, poderá colonizar os camarões cultivados gerando um produto de má qualidade com péssima repercussão no mercado.

Bhaskar *et al.* (1995) analisando ambientes de cultivo e camarões cultivados na Índia encontraram *Salmonella* em todas as amostras estudadas. Os autores não relacionam a presença com bactérias indicadoras de contaminação fecal, pois as salmonelas estão presentes na microbiota autóctone destes ambientes. Segundo Reilly, Twiddy e Fuchs (1992), a maior fonte de *Salmonella* no sedimento das fazendas de cultivo de camarão se deve ao uso de esterco não tratado na fertilização dos viveiros, uma prática não utilizada nos cultivos no Brasil. Segundo Brito, Costa e Oliveira (2006), os principais fertilizantes utilizados nos viveiros de criação de organismos aquáticos no Nordeste do Brasil são uréia e superfosfato triplo. Outros fertilizantes também são empregados, tais como: nitratos, fosfatos e sulfatos. Portanto, quando se detecta *Salmonella* nos cultivos no Brasil, supõe-se que seja pelo aporte de esgotos e/ou pela presença de animais soltos no ambiente. Pode-se atribuir também à fonte alimentadora das fazendas uma vez que, Carvalho *et al.* (2009) estudando outra fazenda abastecida também pelo Rio Jaguaribe, detectaram 14 cepas de *Salmonella* em amostras de água e sedimento de viveiro. Para Bhaskar *et al.* (1995), a detecção desse microrganismo em amostras de sedimento é dada pela sua estratégia de sobrevivência no substrato, podendo, posteriormente, ser transferida para a água e para o camarão.

As salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas no campo de saúde pública em todo mundo, destacando-se por suas características de endemicidade, morbidade e, em particular, pela dificuldade de seu controle. Toda essa consequência decorre dos múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos, circunstanciados, principalmente pelas inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo (HOFER; SILVA; REIS 1998).

Nos Estados Unidos há uma estimativa de que ocorram 1,4 milhão de casos de salmoneloses a cada ano, sendo que os surtos epidêmicos, em sua maioria, estão associados ao

sorovar *S. Enteritidis*, sendo leite, carnes e ovos de galinha, os principais veículos de transmissão (BRADEN, 2006).

Bangtrakulnonth *et al.* (2004) trabalharam com 44.087 cepas de *Salmonella* isoladas de humanos e 26.148 de frangos, frutos do mar, outros produtos alimentares e água, na Tailândia, por 10 anos (entre 1993-2002). Os autores relataram que de 1.007 estirpes de *Salmonella* isoladas de frutos do mar, o sorovar mais comum foi *S. sor. Weltevreden*, não isolado na presente pesquisa. Da mesma maneira, os sorovares mais comuns nas 984 amostras de água na Tailândia foram: *S. sor. Weltevreden*, *S. sor. Anatum*, *S. sor. Rissen* e *S. sor. Derby*. Todos os sorovares pertenciam à espécie *Salmonella enterica*. Apesar de não ter havido coincidência no isolamento dos sorovares encontrados naquele país oriental com os encontrados no Ceará, todos os isolados são patogênicos ao homem e estão relacionados à gastroenterite humana. Os autores reforçaram a importância do conhecimento da ocorrência e da epidemiologia de diferentes sorovares em diferentes países.

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2008, foram registrados, oficialmente, quinze surtos de origem alimentar: oito na Bahia, três em São Paulo, um no Amazonas, um no Maranhão, um em Sergipe e um no Rio Grande do Sul. Nesses surtos, em 64% dos casos a contaminação ocorreu através da água, 14% por ingestão de sanduíches contaminados, 7% pelo consumo de maionese, 7% por múltiplos alimentos e 7% pela ingestão de ostras cruas (BRASIL, 2009). Além dessas fontes alimentares, a possibilidade de contaminação humana pelo consumo dos camarões traz prejuízo econômico para atividade gerado pela limitação na comercialização do produto no exterior, onde a isenção ou a minimização desse patógeno nos sistemas produtivos e de transformação são exigências do mercado internacional.

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, ocorreram 1275 surtos de *Salmonella* no período de 1999 – 2008, correspondendo a 42,9 % do total de surtos de DTA no país.

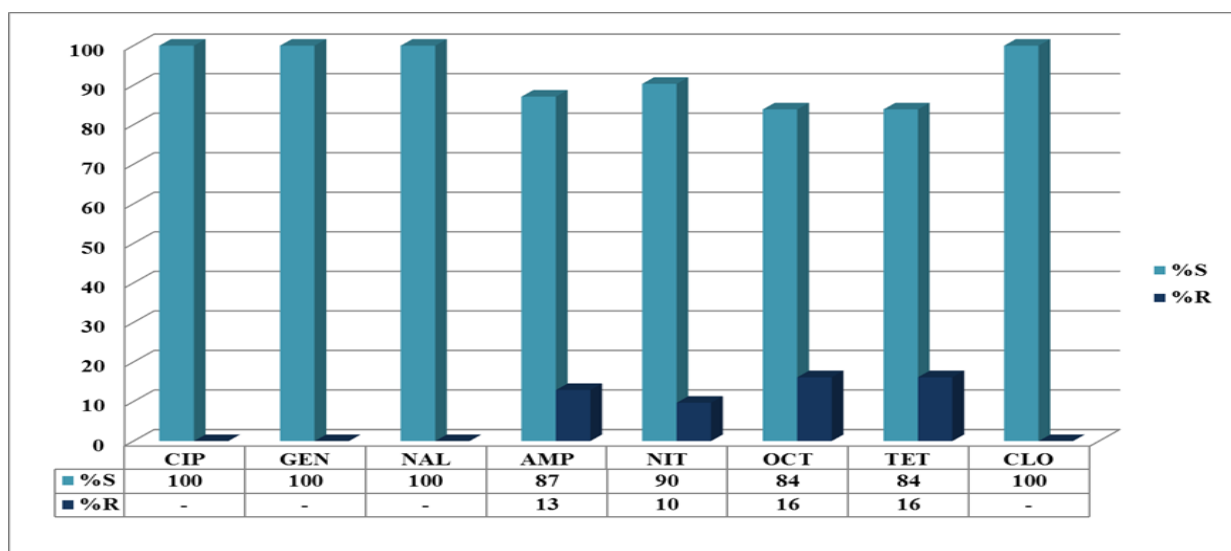
4.4.1 Suscetibilidade das cepas de *Salmonella* aos antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são utilizados na profilaxia e tratamento de infecções em aquicultura. Todavia, a administração indiscriminada e abusiva desses fármacos em cultivo de organismos marinhos pode acarretar alterações na microbiota gerando o desenvolvimento de estirpes resistentes, devido à troca de plasmídeos-R (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

No gráfico 2 estão expostos os resultados da susceptibilidade/resistência das estirpes de *Salmonella* isoladas de amostras ambientais (água, sedimento dos viveiros e do Rio Jaguaribe) de cultivo de camarão marinho adaptado para água doce.

Das 30 estirpes de *Salmonella* analisadas, 5 (16,7%) apresentaram resistência a mais de um agente antimicrobiano. Os antimicrobianos CIP, GEN, NAL e CLO se mostraram 100% eficazes contra as estirpes testadas (Gráfico 2). Os fármacos NIT, AMP, OTC e TET mostraram uma eficiência variando de 84 a 90% contra as estirpes testadas. Mesmo o pequeno percentual de resistência apresentado é preocupante, uma vez que essas drogas são amplamente utilizadas na prática médica.

Gráfico 2- Percentual de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos de 30 estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas A e B.



CIP-ciprofloxacina; GEN-gentamicina; NAL-ácido nalidíxico; OTC-oxitetraciclina; AMP-ampicilina; TET-tetraciclina; NIT-nitrofurantoina; CLO-cloranfenicol; CFL-cefalotina; FLF-florfenicol. S-sensível; R-Resistente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Broughton e Walker (2009), ao analisarem a susceptibilidade a antimicrobianos de estirpes de *Salmonella* isoladas de peixes comercializados em mercados na cidade Guangdong, na China. Os autores observaram que os maiores percentuais de sensibilidade foram relacionados aos seguintes agentes antimicrobianos: CIP, GEN, NAL e CLO (100%, 80%, 60% e 80%, respectivamente). Em contrapartida, Zhang, Li e Sun (2011), analisando a resistência de 217 isolados de bactérias heterotróficas provenientes de cultivos de camarão de Donghai Island, China, encontraram resistência bacteriana entre 10% e 30% para os fármacos CIP, GEN, NAL e CLO. Os autores relataram a necessidade de um monitoramento frente às drogas antimicrobianas empregadas na carcinicultura e a necessidade de criação de uma regulamentação sobre o uso dessas drogas

nos cultivos, o que diminuiria os riscos de resíduos desses fármacos para o ambiente circundante.

Holmström *et al.* (2003) relataram que nas fazendas de camarão na Tailândia é utilizado um grande número de agentes antimicrobianos. Para os autores, o equilíbrio ambiental e a saúde humana podem ser afetados pelo uso abusivo dessas drogas na aquicultura. Para Yang *et al.* (2010), as salmoneloses causadas pela ingestão de alimentos podem ter seu tratamento prejudicado devido ao uso de agentes antimicrobianos como promotor de crescimento dos animais cultivados o que favorece ao surgimento de cepas com perfil de multirresistência.

Hatha, Maqbool e Kumar (2005) afirmam que os antimicrobianos pertencentes ao grupo das tetraciclina são amplamente utilizados para tratar e prevenir enfermidades na aquicultura, porém, tem-se observado maior frequência de isolamento de bactérias resistentes a essa droga, oriundas do ambiente aquícola.

Os antimicrobianos oxitetraciclina, tetraciclina e cloranfenicol são largamente utilizados na prática veterinária como aditivos da alimentação para promover o crescimento devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias e o seu baixo custo (WANG *et al.*, 2008).

Na presente pesquisa nenhuma cepa foi resistente o cloranfenicol. Possível antimicrobiano proibido em alimentos pela comunidade europeia (MENDES *et al.*, 2004) e pelo Brasil (MAPA-BRASIL, 2003). Segundo Rahamn *et al.* (2010), o motivo principal de proibição é o sério risco para a saúde humana, inclusive relacionado ao surgimento do quadro de aplasia medular

No Brasil não existe permissão para o uso de antibióticos na carcinicultura embora a Instrução Normativa Nº 42 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA (BRASIL, 1999) recomende como medida profilática tetraciclina, eritromicina e oxitetraciclina contra o agente da necrose hepatopancreática (NPH), bem como nas doenças determinadas por bactérias psicrófilas e nas septicemias hemorrágicas causadas por *Pseudomonas sp*, *Edwardsiella sp* e *Aeromonas spp* em peixes.

Oxitetraciclina é uma droga amplamente usada no tratamento de doenças bacterianas em pescado marinho e a dose recomendada para tratamento é de 5 a 10 vezes maior do que as comumente usadas nas práticas médicas (LUNESTADT; GOKSOYR, 1990). Inevitavelmente, a maior parte termina no meio ambiente, especialmente no sedimento das fazendas de aquicultura. As tetraciclina e oxitetraciclina possuem sítios de ligação para íons de metal, principalmente magnésio e cálcio (LAMBS; BRION; BERTHON, 1984). A interferência desses íons já foi relacionada com a redução da atividade biológica das

tetraciclina em ambientes marinhos (REBOUÇAS *et al.*, 2011). Embora o cultivo analisado neste trabalho em ambiente de água doce, as águas do Rio Jaguaribe (o rio do estudo) são classificadas como moderadamente duras, por apresentarem níveis elevados de íons de cálcio e magnésio (BRASIL, 2008). Portanto, essa característica de dureza da água é um fator potencial de interferência na ação dos antimicrobianos da classe das tetraciclina no ambiente de cultivo dos camarões em água doce.

Akinbowale, Peng e Barton (2006) detectaram cepas resistentes à ampicilina, à tetraciclina e à oxitetraciclina em isolados bacterianos de organismos aquáticos e cultivados de ambiente originários da aquicultura nos Estados Unidos, Dinamarca, Noruega, Reino Unido e Canadá.

Ribeiro *et al.* (2010) em estudo recente no Brasil, relataram um índice de resistência a antimicrobianos de 15,1% em salmonelas isoladas de um sistema de aquicultura. Os sorovares encontrados, *S. sor. Mbandaka* e *S. sor. Agona* foram resistentes à tetraciclina; *S. sor. Albany* a trimetoprim-sulfametoxazol e *S. sor. London* a cloranfenicol.

Vieira *et al.* (2010) pesquisando a susceptibilidade aos antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas de camarão e de ambientes de carcinicultura encontraram cerca de 33,3% dos isolados, resistentes à TET. O percentual de bactérias resistentes detectado pelos autores foi mais alto do que o encontrado nesta pesquisa.

Melo *et al.* (2011) estudando o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de amostras frescas e refrigeradas de *Litopenaeus vannamei* coletados nos supermercados em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, também encontraram cepas resistente à AMP, corroborando com esta pesquisa.

Para Silva e Duarte (2002), existe um consenso em diversos países de que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal tem sido uma das causas do aumento da resistência microbiana.

Na leitura dos resultados do antibiograma uma estirpe (Sa12a), apresentando crescimento dentro dos halos de sensibilidade à tetraciclina e à oxitetraciclina. Um isolamento e testes posteriores confirmaram que não se tratava de contaminação por outro microrganismo, mas da mesma bactéria caracterizando uma subpopulação da cultura com fenótipo de resistência codificado como Sa12a. Segundo Manjusha *et al.* (2005), o monitoramento da incidência da múltipla resistência aos antibióticos em bactérias isoladas de ambientes aquáticos é de grande importância a fim de se ampliar os conhecimentos acerca da microbiota, da utilização de drogas e seus efeitos sobre a terapia em camarão, bem como em doenças humanas.

Tabela 11- Perfil de resistência a antimicrobianos entre as estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento dos viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.

Localização	Fonte	Cepas	Perfil de resistência	IRA	MAR
Fazenda A	Viveiro	Sa1	-	-	-
	Rio	Sa2	-	-	-
		Sa3	TET, OTC	0,008	-
		Sa4	-	-	-
		Sa5	-	-	-
		Sa6	-	-	-
Fazenda B	Viveiro	Sa8	-	-	-
	Rio	Sa9	-	-	-
		Sa10	-	-	-
		Sa11	AMP	0,004	-
		Sa12	-	-	-
		Sa12a*	TET, OTC	0,008	-
		Sa13	-	-	-
		Sa14	-	-	-
		Sa15	-	-	-
		Sa16	AMP, NIT, OTC, TET	0,016	0,37
		Ss17	AMP, NIT, OTC, TET	0,016	0,37
		Ss18	AMP, NIT, OTC, TET	0,016	0,37
		Ss19	-	-	-
		Ss20	-	-	-
		Ss21	-	-	-
		Ss22	-	-	-
		Ss23	-	-	-
		Ss24	-	-	-
		Ss25	-	-	-
		Ss26	-	-	-
	Ss27	-	-	-	
Ss28	-	-	-		
Ss29	-	-	-		
Ss30	-	-	-		
Ss31	-	-	-		

MRA: Múltipla resistência a antimicrobianos; IRA: Índice de resistência a antimicrobianos; A: amostra de água; S: amostra de sedimento; S12a*: subpopulação.

Nesse sentido, Cabello (2006) afirma que drogas residuais permanecendo no sedimento, exercem pressão seletiva, alterando a composição da microbiota, selecionando bactérias resistentes aos antibióticos.

Segundo Yates *et al.* (2004), os genes de resistência são comumente transferidos por plasmídeos, transposons, genes cassetes ou outros elementos genéticos móveis, permitindo que essa passagem horizontal ocorra entre linhagens, espécies e vários gêneros.

O índice de resistência a antimicrobianos (IRA) das amostras variou de 0,008 a 0,016 sugerindo que as amostras bacterianas podem representar um risco para a disseminação de genes de resistência. O índice de múltipla resistência (MRA) nas cepas foi de 0,37. O valor encontrado permite supor que a multirresistência entre bactérias pode estar relacionada com a disseminação de elementos genéticos móveis ou com a seleção de amostras mutantes. Carvalho *et al.* (2009) também encontraram em cepas de *Salmonella*, isoladas de água e sedimentos de camarão marinho cultivado em fazendas de Aracati e Coreaú (CE), MRA para tetraciclina e ácido nalidíxico, de 0,29 a 0,43, concordando com os dados apresentados nesta pesquisa.

Na Tabela 12 encontram-se os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos (tetraciclina, oxitetraciclina, ampicilina e nitrofurantoina) para os quais as estirpes de *Salmonella* se mostraram resistentes. O único isolado da fazenda A (cepa Sa3 - *S. sor. Madelia*) apresentou o mesmo valor de CIM para TET e OTC, por outro lado, a CBM da TET foi superior a da OTC.

Tabela 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de antibióticos das *Salmonella* spp. isoladas de amostras ambientais de água e sedimento de viveiros das fazendas A e B e do rio Jaguaribe abastecedor das fazendas.

Localização	Amostras	Cepas	Concentração dos antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)							
			TET		OTC		AMP		NIT	
			CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Fazenda A	Rio	Sa3	64	256	64	128	x	x	x	x
Fazenda B	Rio	Sa11	64	64	64	64	640	>640	x	x
		Sa12a*	64	256	128	1.024	x	x	x	x
		Sa16	128	256	64	512	>640	>640	6.400	>12.800
		Ss17	64	256	64	512	>640	>640	6.400	>12.800
		Ss18	64	256	64	512	>640	>640	12.800	>12.800

TET: tetraciclina; OTC: oxitetraciclina; AMP: ampicilina; NIT: nitrofurantoina; *subpopulação; x: sem resistência.

Ao contrário dos dados apresentados acima Rebouças *et al.* (2011) trabalhando com amostras de camarões marinho e água das fazendas de carcinicultura abastecidas pelo o mesmo rio detectaram cepas de *Vibrio* resistentes a oxitetraciclina com valores de CIM variando de 434 a 698 $\mu\text{g/mL}$. A resistência a esse antimicrobiano se faz notar em grupos bacterianos distintos, embora a assimilação de cada um seja diferente. O importante é que

famílias bacterianas autóctones e alóctones sofrem o mesmo prejuízo e a mesma pressão seletiva do ambiente.

Foram observados os mesmos valores de CIM e CBM para TET e OTC na cepa Sa11. Quando testado o antimicrobiano AMP, verificou-se que o CBM foi semelhante o CIM.

O isolado Sa12 (*S. sor. Panama*) foi sensível a todos os antimicrobianos testados, mas apresentou uma subpopulação (Sa12*) resistente à TET e à OTC, com valores de CIM no intervalo de 32 a 64 µg/mL e de 64 a 128 µg/mL, respectivamente. Os valores da CBM para TET e OTC foram de 256 µg/mL e 1.024 µg/mL, respectivamente.

Coincidindo com os resultados da presente pesquisa, Li *et al.* (2010), analisando a resistência a TET, OTC e AMP de bactérias ambientais oriundas da água do rio Xiao na China, obtiveram valores de CIM: 128 µg/mL; 256 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Esses resultados sugerem que a prevalência da resistência e os níveis de antimicrobianos encontrados em ecossistemas aquáticos podem favorecer o surgimento de estirpes resistentes devido a seletividade sofrida por estes microrganismos nos ambientes hosts. Em contrapartida, Madukosiri, Edike e Ghandi (2009) encontraram valores inferiores de CIM para TET e AMP (2 µg/mL) em 35 isolados de *S. sor. Typhi* provenientes de amostras fecais de pacientes do Hospital Federal Medical Centre em Yenagoa na Nigéria. Os autores afirmam que, apesar dos valores terem sido baixos é necessário o monitoramento de cepas com perfis de resistência.

O aumento de cepas resistentes a antimicrobianos de uso rotineiro na clínica humana é um problema de saúde pública sendo importante a utilização dos testes de sensibilidade antes do tratamento. Técnicas de difusão em disco e a utilização de CIM e CBM são comumente usadas para testar a eficiência dos antimicrobianos contra os microrganismos (NESTER *et al.*, 2004).

Os isolados de *S. sor. Braenderup* (Sa16, Ss17 e Ss18) apresentaram valores semelhantes de CIM e CBM para TET, OTC, AMP e NIT. O perfil coincidente entre estas estirpes pode significar que os isolados, na verdade, são clones uma vez que compartilham a mesma origem e o mesmo perfil de susceptibilidade.

Outro fato que merece destaque foi a detecção de estirpes de *Salmonella* resistentes a oxitetraciclina, um antimicrobiano que é comumente utilizado em fazendas de criação de camarão. De acordo com Mendes *et al.* (2004), o uso de algumas drogas é permitido pelo Food and Drugs Administration (FDA) em atividades de aquicultura, sendo o oxitetraciclina recomendado para terapia de doenças bacterianas em “catfish” e salmão, no entanto, nenhuma alusão é feita da sua utilização em fazendas de camarões.

Segundo Pereira Junior *et al.* (2006), o uso de OTC (família das tetraciclina) no Brasil é comum em pisciculturas comerciais para o controle de doenças bacterianas e como medida profilática. Seu uso contínuo pode causar aumento na frequência de isolados bacterianos resistente, dificultando os tratamentos futuros de salmoneloses humanas, elevando o risco na cadeia alimentar humana.

A Instrução Normativa Nº 09, de 27 de junho de 2003, do Ministério da Agricultura e Abastecimento proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos dos nitrofuranos para uso veterinário e seu suscetível emprego na alimentação de todos os animais e insetos, entretanto, ainda hoje são encontradas bactérias, em sedimentos de fazendas de camarões, resistentes aos antimicrobianos (MAPA-BRASIL, 2003).

Os nitrofuranos foram proibidos na China e em outros países desde 1995, devido a sua capacidade de mutagenicidade e de carcinogenicidade (CHANG *et al.*, 2008). Em trabalho realizado por Broughton e Walker (2010) na China foram detectadas três cepas de *Salmonella* resistentes à nitrofurantoína, conseqüentemente, o que levou os autores a afirmarem que esse antimicrobiano ainda está sendo utilizado.

A Comissão Européia em 2008 revelou que, mesmo com a proibição dos nitrofuranos, este foi encontrado em produtos originários de nove países no ano de 2007, sendo que as maiores incidências foram nos produtos da Índia (37%), da China (37%), de Bangladesh (10%) e da Tailândia (5%), incluindo camarão, mel e carne enlatada.

Para Blackwell, Kay e Boxall (2007), os antibióticos podem atingir diretamente o ambiente por meio das excreções dos animais e indiretamente pela aplicação de esterco animal no solo.

Kemper (2008) ressalta que a quantidade de antibióticos excretada varia com o tipo de substância, dosagem, espécie e idade do animal, entre outros fatores. Segundo Sarmah, Meyer e Boxall (2006), os ingredientes ativos administrados aos animais podem ser integralmente eliminados sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo. As tetraciclina e os macrolídeos apresentam baixa taxa de metabolismo (< 20% da dose administrada), enquanto as lincosamidas, as fluoroquinolonas e as sulfonamidas apresentam taxa de metabolismo de moderada a elevada (>20 % da dose). Os aminoglicosídeos têm comportamento bastante variável (REGITANO; LEAL, 2010). Por outro lado, os nitrofuranos são rapidamente metabolizados no organismo, deixando de ser detectáveis no sangue ou nos tecidos dos animais pouco tempo após sua administração de 2 a 4 dias, dependendo da dose.

De acordo com Stepanauskas *et al.*; (2006), os resíduos de antimicrobianos no meio ambiente impõem pressão seletiva sobre as populações de bactérias, o que resulta na prevalência de bactérias resistentes.

Após a verificação do perfil de susceptibilidade, foi observado que seis isolados apresentaram mono e multirresistência. Após o tratamento de “cura”, as cepas com caráter de monorresistência, mantiveram o mesmo perfil, indicando que, essa característica pode ser cromossômica e duas cepas multirresistentes não sofreram alterações no seu perfil após a exposição ao agente curagênico. Porém, uma cepa (16,7%) a (Ss18) isolada do sedimento do rio da fazenda B perdeu a resistência à AMP e a NIT após a cura, caracterizando um fenótipo plasmidial. Da mesma forma, foi encontrado um perfil de susceptibilidade de *E. coli* semelhante de *Salmonella* onde foi verificado resistência a AMP, TET e OTC e um perfil intermediário a NAL. Os isolados da fazenda A (E4 e E5) e da fazenda B (E23 e E24) não perderam a resistência a TET após a cura, o que caracteriza um fenótipo, provavelmente, de origem cromossômica (Tabela 7).

Resultados semelhantes foram observados por Figueirêdo (2008), que encontrou percentuais baixos (25%) de perda plasmidial em isolados de *Salmonella* provenientes de dois estuários do estado do Ceará. Outrossim, Imre *et al.* (2006), utilizando o brometo de etídio como agente curagênico, observaram que após 40 gerações de *S. sor. Enteritidis* (SE2102) ocorreu uma perda plasmidial <0,4%. Segundo os autores, a eliminação ou modificação de plasmídeos em bactérias é, na maioria das vezes, um passo essencial na análise funcional desses genes.

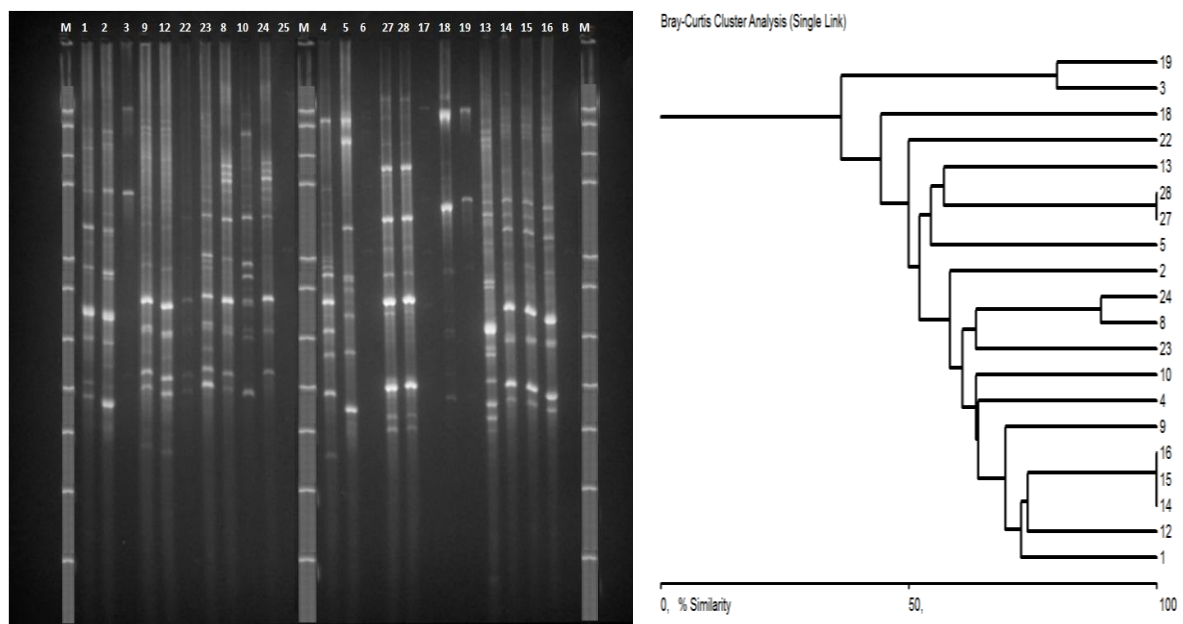
Segundo Padilha (2004), apesar de não ser clara a associação entre o uso de antibióticos nas unidades de produção animal e o desenvolvimento de resistência e sua transferência à população humana, vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de derivados animais seja uma possível via de transmissão de bactérias resistentes.

4.4.2 Box-PCR

A análise de similaridade entre as cepas foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas geradas a partir da amplificação com iniciador específico BoxAIR. As diferenças e similaridades foram analisadas visualmente de acordo com o comportamento de migração das bandas dos produtos da reação de PCR (Figura 9). Para a obtenção de uma matriz de similaridade foi usado um coeficiente simples de similaridade (coeficiente de Jaccard).

As limitações encontradas nas análises baseadas no fenótipo de salmonelas têm levado ao progressivo desenvolvimento de estratégias genotípicas. Entre os métodos moleculares utilizados na tipagem genômica de *Salmonella* de diferentes fontes, a técnica Box-PCR foi utilizada por vários autores (ALBUFERA *et al.*, 2009;ALCOCER *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009). Este método é baseado na amplificação de sequências de DNA por PCR com *primers* complementares às sequências de DNA repetitivas, altamente conservadas, e presentes em múltiplas cópias em posições intergênicas distintas no genoma na maioria das bactérias Gram-negativas e em várias Gram-positivas (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992). A genotipagem bacteriana dá oportunidade para estudos epidemiológicos, identificação de isolados clínicos e ambientais, monitoramento de disseminação de clones e caracterização de populações bacterianas dentro de ambientes mais ou menos restritos (OLIVE; BEAN, 1999).

Figura 9 - Perfil de similaridade de isolados de *Salmonella* de amostras ambientais, baseado na presença e ausência de bandas no gel de Box-PCR das amostras de água e sedimento.



Analisando-se o dendrograma (Figura 9) pode-se constatar a formação de dois grupos principais. Um que agrupa três estirpes (um sorovar *S. sor. Madelia* e dois sorovares *S. sor. enterica* subs. *houtenae*) isolados da mesma área de cultivo (Fazenda A). O outro agrupamento (Fazenda B) que concentrou isolado de diferentes fontes, áreas de cultivos e sorovares (dois *S. sor. Saintipaul*, três *S. sor. Infantis*, dois *S. sor. Panama*, um *S. enterica* subs. *enterica* e *S. sor. enterica* subs. *houtenae*).

Não foi possível verificar correlação entre os sorovares fenotipicamente identificados e o local de coleta. Da mesma forma, características do ambiente como a matriz de origem (água ou sedimento) não foi determinante nesse estudo para estabelecer um modelo de distribuição dos sorovares de *Salmonella*. O agrupamento com maior índice de similaridade foi composto por diferentes sorovares (10, 4, 9, 16, 15, 14, 12 e 1) tendo em comum a matriz de origem (amostras de água de viveiro e rio).

Dentro deste grande grupo, podem-se verificar subgrupos com percentuais de similaridade bem maiores: dois sorovares (27, 28) de *S. enterica* subsp. *houtenae* isolados de sedimento do rio abastecedor da fazenda B e apresentando o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados apresentando perfil de 100% de similaridade. Da mesma forma, sorovares Madelia (14, 15 e 16) isolados na mesma área agruparam com percentual semelhante. Entretanto, outro sorovar Madelia (13) isolado nas mesmas condições (amostras de água da fazenda B) apresentou um coeficiente de similaridade pouco maior que 50% com os isolados 14, 15 e 16. A similaridade foi independente do local de isolamento o que pode indicar a presença de diferentes clones.

Em trabalho realizado por Albufera *et al.* (2009), dezoito isolados de *Salmonella* de fontes humana e não-humana (alimentos) foram caracterizados através de métodos de cultura convencionais, bioquímicos, sorológicos e moleculares. O perfil genômico dos sorovares de *Salmonella* mostrou que a maioria dos isolados humanos foi diferente dos isolados não-humanos.

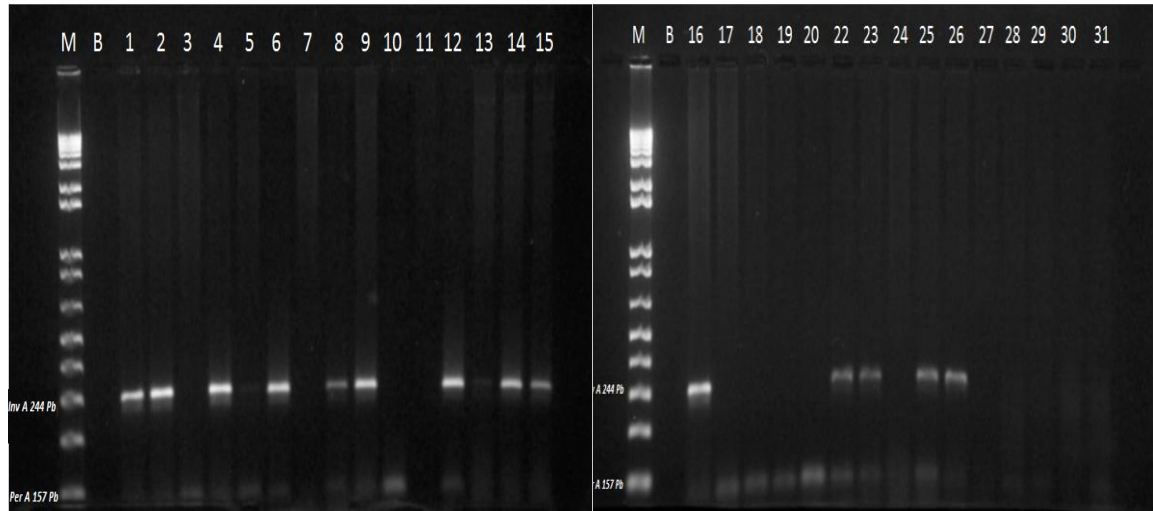
Wheeler, Cann e Mackie (2011) ao analisarem o *fingerprinting* genômico e a sorotipagem de *Salmonella* isoladas de Iguanas (marinhas e terrestres) de duas ilhas (Santa Fe e Plaza Sur) localizadas em Galápagos, observaram baixa similaridade nos ecotipos de *Salmonella* nas duas ilhas analisadas. Em relação a *S. sor. Panama*, os autores encontraram baixa similaridade desses sorovares isolados das iguanas marinhos e terrestres da ilha Plaza Sur. Esse sorovar também foi encontrado na pesquisa em estudo, com baixa similaridade nos ecotipos de *Salmonella*.

4.4.3 Detecção dos genes de virulência

A virulência da *Salmonella* está relacionada a uma combinação de fatores cromossômicos e plasmidiais (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Para Rodrigues (2005), a virulência está relacionada à habilidade da cepa em penetrar e se replicar nas células epiteliais, à resistência a ação do sistema complemento, à produção de toxinas e à resistência a antimicrobianos.

A figura 10 mostra o perfil eletroforético das reações de Multiplex-PCR das cepas identificadas como *Salmonella* spp. utilizando *primers* de virulência: *pefA*, *invA* e *spvC*.

Figura 10 - Detecção dos genes de virulência *pefA*, *invA* e *spvC* amplificado pela técnica de Multiplex-PCR de *Salmonella* em amostras ambientais.



Os genes de virulência *pefA* e *invA* foram detectados na maioria das amostras, mas o gene *spvC* não foi encontrado em nenhuma amostra testada. Das 30 amostras analisadas foram encontrados 14 isolados com gene *pefA* e 15 com o gene *invA* (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados de Multiplex-PCR de *Salmonella* para detecção dos genes de virulência.

Genes de Virulência detectados no PCR				
Isolados	Sorovares	<i>pefA</i>	<i>invA</i>	<i>spvC</i>
1	<i>S. sor. Saintpaul</i>	-	+	-
2	<i>S. sor. Saintpaul</i>	-	+	-
3	<i>S. sor. Madelia</i>	+	-	-
4	<i>S. enterica subsp. houtenae</i>	+	+	-
5	<i>S. enterica subsp. houtenae</i>	+	-	-
6	<i>S. enterica subsp. houtenae</i>	+	-	-
8	<i>S. sor. Infantis</i>	+	+	-
9	<i>S. sor. Panama</i>	+	+	-
10	<i>S. sor. Infantis</i>	+	-	-
11	<i>S. sor. Panama</i>	-	-	-
12	<i>S. sor. Panama</i>	+	+	-
13	<i>S. sor. Madelia</i>	-	-	-
14	<i>S. sor. Madelia</i>	-	+	-
15	<i>S. sor. Madelia</i>	-	+	-
16	<i>S. sor. Madelia</i>	-	+	-
17	<i>S. sor. Braenderup</i>	+	-	-
18	<i>S. sor. Braenderup</i>	+	-	-
19	<i>S. sor. Braenderup</i>	+	-	-
20	<i>S. sor. Braenderup</i>	+	-	-
22	<i>S. enterica subsp. enterica</i>	+	+	-
23	<i>S. enterica subsp. enterica</i>	+	+	-
24	<i>S. sor. Infantis</i>	-	+	-
25	<i>S. sor. Infantis</i>	+	+	-
26	<i>S. sor. Infantis</i>	-	+	-
27	<i>S. enterica subsp. houtenae</i>	-	+	-
28	<i>S. enterica subsp. houtenae</i>	-	-	-
29	<i>S. sor. Infantis</i>	-	-	-
30	<i>S. sor. Madelia</i>	-	-	-
31	<i>S. sor. Madelia</i>	-	-	-

+-presença do gene; - ausência do gene

Turki *et al.* (2012,) analisando a presença de genes de virulência *invA* e *spvC* e a multirresistência em cepas de *S. sor. Kentucky*, oriundas de fontes ambientais (dejetos, solo e águas residuais), animais, alimentos e humanos, na Tunísia, encontraram resultados de *spvC* semelhantes aos da presente pesquisa. Da mesma maneira, Amini *et al.* (2010), investigando

genes de virulência em *S. sor. Enteritidis* isolada de humanos e animais no Irã , detectaram o gene *invA* em todas as amostras.

Em contrapartida, Smith *et al.* (2010) pesquisando o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a genotipagem de *S. enterica* isolada de casos clínicos de salmonelose no Novo México em 2008, encontraram o gene *invA* para todos os isolados e o gene *pefA* somente para três. Por outro lado, Okamoto *et al.* (2010) encontraram *invA* (3%) e *spvC* (26%) nas amostras de *Salmonella* Enteritidis em vísceras e carcaça de frango. Esse baixo percentual se deve às condições as quais a bactéria é exposta para crescimento. *Salmonella* pode apresentar genes relacionados a invasão e virulência (*invA* e *spvC*), mas nem sempre são capazes de expressá-los. De acordo com Craciuna *et al.* (2012) o gene *invA* é conservado nas espécies e nos sorovares, sendo considerado alvo para detecção de *Salmonella*. Esse gene não é encontrado em outra bactéria.

5 CONCLUSÕES

- Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa a partir da análise de amostra ambientais coletadas em áreas de cultivo de camarão não foi possível detectar uma relação direta entre a densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*E. coli*) e a presença de *Salmonella*.
- O meio seletivo caldo triptose MUG utilizado não mostrou eficiência no favorecimento do crescimento da bactéria-alvo (*E. coli*) o que ficou nítido com os baixos níveis de confirmação entre as culturas suspeitas isoladas.
- Devido a pouca variação, os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e salinidade) não influenciaram quantitativamente no isolamento de cepas de *E. coli* e *Salmonella*.
- Entre os isolados de *Salmonella* cinco diferentes sorovares foram identificados: *S. sor. Saintpaul*, *S. sor. Infantis*, *S. sor. Panama*, *S. sor. Madelia*, *S. sor. Braenderup*, e *S. enterica subsp. Houtenae* e *S. enterica subsp. enterica*. Entretanto, não foi possível estabelecer um rastreamento de distribuição das amostras com base na origem ou associado ao local de coleta.
- Entre as culturas isoladas foram detectados percentuais preocupantes de resistência frente a antimicrobianos tanto de uso na clínica humana como animal, com efeito inibitório (CIM e CBM) dos fármacos alcançados apenas em concentrações elevadas principalmente para ampicilina e nitrofurantoína.
- A origem genética das resistências se mostrou diferente para os dois grupos de enterobactérias: enquanto para *E. coli* a maioria se mostrou relacionada à presença de plasmídeo, já nos isolados de *Salmonella* o fenótipo esteve potencialmente associado ao cromossomo ou a elementos móveis estáveis não afetados pela técnica de cura plasmidial através do agente mutagênico *acridine Orange*.
- A presença dos genes *pefA* e *invA* nas culturas de *Salmonella* que codificam fatores de virulência foi inconstante não apresentando um padrão homogêneo entre sorovares ou entre a origem ambiental dos isolados.

REFERÊNCIAS

- ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão). Estatística do setor pesqueiro e da carcinicultura brasileira. Disponível em: <www.abccam.com.br> Acesso em: 05 jan. 2011.
- ABRAHAM, T. J.; GHOSH, S.; NAGESH, T. S.; SASMAL, D. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. **Aquaculture**, Amsterdam, v.239, n.1- 4, p.275–288, sept. 2004.
- ADAM, D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.50, sup.1, p.1-5, jul. 2002.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.100, n.5, p.1103-1113, may 2006.
- ALBUFERA, U.; BHUGALOO-VIAL, P.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY- FAKIM, Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v.9, n.3, p.322-327, may 2009.
- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K. M. P.; VIDOTTO, M. C.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar enteritidis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.2, p.414-420, abr./jun. 2006.
- ALTERTHUM, F. Mecanismos de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 9. p.79-84.
- AMINI, K.; SALEHI, T. Z.; NIKBAKHT, G.; RANJBAR, R.; AMINI, J.; ASHRAFGANJOOEI, S. B. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* enteritidis isolated from human and animals in Iran. **African J. Microbiol. Res.**, Nairobi, v.4, n.21, p.2202-2210, nov. 2010.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. A. E. Greenberg; L. S. Clesceri; A. D. Eaton. (eds.). APHA/AWWA/WEF, 2000. p.1-10.
- 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. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, abr./jun. 2002.
- BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D. ; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.114, n.3-4, p.173-186, may 2006.
- BANGTRAKULNONTH, A.; PORNREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; SAWANPANYALERT, P.; HENDRIKSEN, R. S.; LO FO WONG, D. M. A.; ARESTRUP, F. M. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.10, n.1, p.131-136, jan. 2004.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotic and antibiotics resistance in water environments. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Londres, v.19, n.3, p.260-265, jun. 2008.

BARCINA, I.; LEBARON, P.; VIVES-REGO, J. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Malden, v.23, n.1, p.1-9, may. 1997.

BEATO, P. G. **Características organolépticas e físico-químicas da carne de piramutaba, *Brachyplatistoma vaillantii* (Siluriformes, Pimelodidae), congelada comercializada em Belo Horizonte, MG.** 2002. 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BERTHE, T.; TOURON, A.; LELOU, J.; DELOFFRE, J.; PETIT F. Faecal indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.57, n.1-5, p.59-67, may, 2008.

BHASKAR, N.; SETTY, T. M. R.; MONDAL, S.; JOSEPH, M. A.; RAJU, C. V.; RAGHUNATH, B. S.; ANANTHA, C. S. Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). **Food Microbiol.**, London, v.15, n.5, p.511-519, sept. 1998.

BHASKAR, N.; SETTY, T. M. R.; REDDY, G. V. S.; MANOJ, Y. B.; ANANTHA, C. S.; RAGHUNATH, B. S.; ANTONY, J. M. Incidence of *Salmonella* in cultured shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.138, n.1-4, p.257-266, Dec. 1995.

BLACKWELL, P. A.; KAY, P.; BOXALL, A. B. A. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. **Chemosphere**, Oxford, v.67, n.2, p.292-299, feb.2007.

BOAVENTURA, M.; CANUTO, A.; FERREIRA, A. Novas diretrizes no cultivo de camarão cinza *Litopenaeus vannamei* para o controle das enfermidades. **Rev. de Aquicultura & Pesca**, São Paulo, n.17, p.25-28, jan./fev. 2006.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.50, n.1-2, p.33-44, sept. 1999.

BRADEN, C. R. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.43, n.4, p.512-517, aug. 2006.

BRANDS, D. A.; INMAN, A. E.; GERBA, C. P.; MARE, C. J.; BILLINGTON, S. J.; SAIF, L. A.; LEVINE, J. F.; JOENS, L. A. Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.71, n.2, p.893-897, feb. 2005.

BRASIL - Instrução Normativa Nº 9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 30 jun. 2003. Seção 1. p.4.

BRASIL- Consorcio Ecology Brasil – AGRAR – JP Meio Ambiente - Projeto de Integração do Rio São Francisco com Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional – Consolidação dos

Estudos Ambientais – **Adendo à Caracterização da Qualidade da Água e Limnologia**. Ministério da Integração Nacional – INPE – FUNCAPE, 2008. 81p

BRASIL- Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 05 jan. 2009. Seção 1. p.2.

BRITO, L. O.; COSTA, W. M.; OLIVEIRA, A. Importância da fertilização em viveiros de camarão marinho. **Rev. Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, n.8, p.35-37, 2006.

BROUGHTON, E. I.; WALKER, D. G. Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in fish in Guangdong, China. **Foodborne Pathog. Dis.**, New Rochelle, v.6, n.4, p.519-521, may. 2009.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v.8, n.7, p.1137-1144, jul. 2006.

CABELLO, F. C. Antibióticos y acuicultura em Chile: consecuencias para la salud humana y animal. **Rev. Méd. do Chile**, Santiago, v.132, n.8, p.1001-1006, aug. 2004.

CAMPOS, L. C. Microbiologia. In: TRABULSI, L. R. (et al.) (ORG). **Salmonella**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.43. p.319-328.

CARDONHA, A. M. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; HOLLAND, H. N.; MELO, J. L. S.; BEZERRA, M. A. S.; DAMASCENO, K. S. F. S. C. Monitoramento da poluição da água das galerias pluviais e do mar por meio de avaliação físico-química e microbiológica. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v.38, p.43-48, 2005.

CARVALHO, F. C. T.; BARRETO, N. S. E.; REIS, C. M. F.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. S. F. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v.40, n.4, p.549-556, out./dez. 2009.

CHANG, C., PENG, D. P., WU, J. E., WANG, Y. L., YUAN, Z. H. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of furazolidone marker residue in animal edible tissues. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.56, n.5, p.1525–1531, mar. 2008

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals**. Guideline. M49-A, v.26, n.24, 2010. 50p.

CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement**. 19th ed. M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2010. v.29, n.3, p.149.

CONAMA, Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 357, 18 de março de 2005.

CRACIUNAS, C.; KEU, A. L.; FLONTA, M.; CRISTEA, M. DNA-base diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **J. Environ. Manag.**, London, v.95, p.15-18, mar. 2012.

- CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.367, n.1, p.23-41, aug. 2006.
- CRUMP, B. C.; ARMBRUST, E. V.; BAROSS, J. A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.7, p.3192–3204, jul.1999.
- DALSGAARD, A.; HUSS, H. H.; H-KITTIKUN, A.; LARSEN, J. L. Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, n.1, p.101-113, nov. 1995.
- DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Genomic Islands In Pathogenic and Environmental Microorganisms. **Nature. Rev. Microbiol.** v.2, p.414-424, may. 2004.
- DUFFY, G.; CLOAK, O. M.; O SULLIVAN, M. G.; GUILLET, A.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. **Food Microbiol.**, London, v.16, n.6, p.623-631, dec. 1999.
- EL-SHAFI, S. A.; GIJZEN, H. J.; NASR, F.; EL-GOHARY, F. Microbial quality of tilapia reared in fecal contaminated ponds. **Environ. Res.**, San Diego, v.95, n.2, p.231-238, jun. 2004.
- FARIAS, M. F.; ROCHA-BARREIRA, C. A.; CARVALHO, F. C. T.; SILVA, C. M.; REIS, E. M. F.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lightfoot 1786) (Mollusca: Bivalvia: Solecurtidae) e da água no estuário do rio Ceará, em Fortaleza-CE. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.36, n.2, p.135-142, dez. 2010.
- FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R, ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. (Ed.). 5.ed. São Paulo: Atheneu; 2008. cap. 43. p. 329-338.
- FIGUEIRÊDO, F. V. **Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de *Salmonella* spp isoladas de dois estuários do estado do Ceará – Brasil**. 2008. 54f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2008.
- FIGUEIREDO, M. C. B.; ARAÚJO, L. F. P.; GOMES, R. B.; ROSA, M. F. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura em águas interiores. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p.167-174, abr./jun. 2005.
- FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 196p.
- GEISSLER, K.; MANAFI, M.; AMOROS, I.; ALONSO, J. L. Quantitative determination of coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.88, n.2, p.280-285, feb. 2000.
- GERBA, C. P.; MCLEOD, J. Effect of sediments on the survival of *E. coli* in marine waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington v.32, n.1, p.114-120, jul. 1976.

GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric salmonella infections. **Curr. Opin Gastroenterol.** v.24, n.1, p.22-26, jan. 2008.

GRAVE, K.; JENSEN, V. F.; MCEWEN, S.; KRUSE, H. Monitoring of antimicrobial drug usage in animals: methods and application. *In: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* ed. Aarestrup, F.M. Washington DC, USA: ASM Press. 2006. chap. 22, p. 375.

GRIFFITH, J. F.; AUMAND, L. A.; LEE, I. M.; MCGEE, C. D.; OTHMAN, L. L.; RITTER, K. J.; WALKER, K. O.; WEISBERG, S. B. Comparison and verification of bacterial water quality indicator measurement methods using ambient Coastal water samples. **Environ. Monit. Assess.**, Dordrecht, v.116, n.1-3, p.335-344. may 2006.

GRIMONT, P.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur; 2007.

HARAKEH, S.; YASSINE, H.; EL-FADEL, M. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. **Environ. Pollut.**, Oxford, v.143, n.2, p.269-277, sept. 2006.

HATHA, A. A. M.; MAQBOOL, T. K.; KUMAR, S. S. Microbial quality of shrimp products of export trade produce from aquaculture shrimp. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.82, n.3, p.213-221, may 2003

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **Int. J. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.294, n.2-3, p.95-102, sept. 2004.

HERNANDEZ, J. Z.; NUNES, A. J. P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Rev. ABCC**, Recife, v.2, n.3, p 55-59, 2001.

HOFER, E.; REIS, E. M. F. *Salmonella* serovars in food poisoning episode recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.36, p.7-9, jan./feb. 1994.

HOFER, E.; SILVA, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.21-27, jan./mar. 1998.

HOFER, E.; ZAMORA, N. R. M.; LOPES, A. E.; MOURA, A. M. C. A. Sorovares de *Salmonella* em carne de eqüídeos abatidos no nordeste do Brasil. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.80-84, abr./jun. 2000.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTTSSON, B. E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v.38, n.3, p.255-266, mar. 2003.

IMRE, A.; OLASZ, F.; KISS, J.; NAGY, B. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids. **Plasmid**, San Diego, v.55, n.3, p.235-241, may. 2006.

- JAY, J. M. Parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento microbiano. In: JAY, J. M. (Ed.). **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 3. p. 51-72.
- JONES, J. G.; GARDENER, S.; SIMON, B. M.; PICKUP, R. W. Factors affecting the measurement of antibiotic resistance in bacteria isolated from lake water. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.60, n.5, p.455-462, may 1986.
- JONES, S. E.; BURGOS, J. M.; LUTNESKY, M. M.; SENA, J. A.; KUMAR, S.; JONES, L. M.; VARELA, M. F. Dairy farm age and resistance to antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolated from dairy topsoil. **Curr. Microbiol.**, New York, v.62, n.4, p.1139-1146, apr. 2011.
- JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v.40, n.7, p.691-699, apr. 2000.
- KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C.; BARNHART, H. M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Sci.**, Seoul, v.77, n.2, p.243-247, feb. 1998.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecol. Indic.**, Amsterdam, v.8, n.1, p.1-13, jan. 2008.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, C. WINN, JR. W. C. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido – 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A. 1465p. 2001.
- KREMPELS, D. Culture and sensitivity test. In: _____ **Case of Infection**. 2006; 8p. Disponível em: <<http://www.bio.miami.edu/hare/warrenpeace06.pdf>> Acesso em : 04 ago. 2009.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.46, n.1, p.165-170, jul. 1983.
- LAMBS, L.; BRION, M.; BERTHON, G. Metalion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 3. Formation of mixed-metal ternary complexes of tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline with calcium and magnesium, and their involvement in the bioavailability of these antibiotics in blood plasma. **Agent. Action.**, Basel, v.14, n.5-6, p.743-750, jun. 1984.
- LE MINOR, L. Bergey's: Manual of Systematic Bacteriology. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Genus Salmonella**. Williams; Wilkins, 8 th, Baltimore M.D. 1984. v. 1. 964 p.
- LEÃO, I. **Antibióticos: A luta contra as bactérias**. São Paulo, 1999. Disponível em: <http://www.usp.br/jorusp/arquivo/1999/jusp496/manchet/rep_res/pesqui1.html> Acesso em: 12 ago. 2009.
- LEE, S. H.; JUNG, B. Y.; RAYAMAHJI, N.; LEE, H. S.; JEON, W. J.; CHOI, K. S.; KWEON, C. H.; YOO, H. S. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. **J. Vet. Sci.**, Seoul, v.10, n.1, p.43-51, mar. 2009.

- LI, D.; YU, T.; ZHANG.; YANG, Y. M.; LI, Z.; LIU, M.; QI, R. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.76, n.11, p.3444-3451, jun. 2010.
- LIBBY, S. J.; LESNICK, M.; HASEGAWA, P.; WEIDENHAMMER, E.; GUINEY, D. G. The *Salmonella* virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v.2, n.1, p.49-58, feb. 2000.
- LIMA, A. S. **Vibrio em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Ceará.** 2007. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- LOUREIRO, E. C. B.; MARQUES, N. D. B.; RAMOS, F. L. P.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, Ananindeua, v.1, n.1, p.93-100, mar. 2010.
- LOURENÇO, M. C. S.; REIS, E. M. F.; VALLS, R.; ASENSI, M. D.; HOFER, E. *Salmonella* enterica subsp houtenae serogroup O:16 in a HIV positive patient: case report. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.46, n.3, p.169-170, may/jun. 2004.
- LUNESTAD, B. T.; GOKSOYR, J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. **Dis. Aquat. Org.**, Olderdorf (Luhe), v.9, n.1, p.67-72, aug. 1990.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **J. Bacteriol.**, Washington, v.174, n.14, p.4525-4529, jul. 1992.
- MADUKOSIRI, C. H.; EDIKE, T.; GHANDI, E. O. Comparative studies of susceptibility of *Salmonella* Typhi to antibiotics and some plant extracts. **N. J. Biochem. Molec. Biol.**, {S.L}, v.24, n.1, p.16-21, 2009.
- MANJUSHA, S.; SARITA, G. B.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **Am. J. Biochem. & Biotech.**, v.1, n.4, p. 201-206, sep. 2005.
- MARTINS, M. T.; PESSOA, G. V. A.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M.J. Z.; MONTEIRO, C. K.; COIMBRÃO, C. A.; MARQUES, E.; IRINO, K. Isolamento de *Salmonella* em ambiente aquático: Significado sanitário. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.19, n.1, p.29-39, jan./mar.1988.
- MCDONALD, K. L.; COHEN, M. L.; HARGRETT-BEAN, N.; WELLS, I. G.; PUHR, N. D.; COLLIN, S. F.; BLAKE, P. A. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.258, n.11, p.1496-1499, sep. 1987.
- MELO, M. T. D.; VIEIRA, R. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; HOFER, E. Coliforms and *Salmonella* in seawater near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceará, Brazil). **Microbiologia SEM.**, Madrid, v.13, n. 4, p. 463-470, dec. 1997.
- MELO; L. M. R.; ALMEIDA, D.; HOFER, E; REIS; C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; SANTOS, A. F. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus*

isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.42, n.4, p.1463-1469, dec. 2011.

MENDES, E. S.; ALVES, C. A. B.; BEZERRA, S. S.; MENDES, P. P.; SANTOS, R. L. Sensibilidade *in vitro* à enrofloxacin e oxitetraciclina de *Vibrio* isolados na larvicultura de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). **Cienc. Vet. Trop.**, Recife, v.7, n.2-3, p.90-97, may/dec. 2004.

MENEZES, F. G. R. **Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do gênero *Vibrio* isoladas em alguns estuários do Estado do Ceará**. 2011. 92f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MOLINA-AJA, A.; GARCIA-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 Microbiol. Lett.**, Malden, v.213, n.1, p.7-12, jul. 2002.

MOTA, C. C.; VIEIRA, H. R.; PUZYNA, I. P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J. F.; CAMARGO, N. L. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis. Relato de um surto ocorrido em Curitiba - PR, Brasil/julho de 1981. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.2, n.3, p.123-126, 1983.

MOTA, R. A.; SILVA; K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J.; SILVA, N. L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

NESTER, E. W.; ANDERSON, D. G.; ROBERTS, C. E.; PEARSALL, N. N.; NESTER, M. T. **Microbiology: A human perspective**. 4th ed, McGraw-Hill: New York. 2004. 817 p.

NIEMELA, S. I.; LEE, J. V; FRICKER, C. R. A comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.95, n.6, p.1285-1292, 2003.

NOBLE, R. T.; WEISBERG, S. B.; LEECASTER, M. K.; MCGEE, C. D.; RITTER, K. Y.; WALKER, K. O.; VAINIK, P. M. Comparison of beach bacterial water quality indicator measurement methods. **Environ. Monit. Assess.**, Dordrecht, v.81, n.1-3, p.301-312, jan./feb. 2003.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Relation between the spvc and inva virulence genes and resistance of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis isolated from avian material. **Int. J. Poult. Sci.**, v.8, n.6, p.579-582, jan. 2009.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.6, p.1661-1669, jun. 1999.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M. I.R.; CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.34, suppl.1, p. 123-124, nov. 2003.

- PADILHA, T. **Resistência antimicrobiana x produção animal: Uma discussão internacional.** 2004. Disponível em:
<<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2546062632/>> Acesso em: 04 dez. 2009.
- PARENTE, L. S.; COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; REIS, E. M. F.; HOFER, E.; FONTELES-FILHO, A. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.48, n.1, p. 46-53, 2011.
- PEREIRA-JR, D. J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C.A.G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.30, n.6, p.1190-1195, dez. 2006.
- PINTO, P. S. A. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.14, n.71, p.39-43, abr. 2000.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (n. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v.155, n.7, p.568-570, sep. 2004.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Porto Alegre: Artemed, 2005. 512 p.
- RAHAMN, S.; KHAN, S. N.; NASER, M. N.; KARIM, M. M. Isolation of *Vibrio* spp. from penaeid shrimp hatcheries and coastal waters of Cox's Bazar, Bangladesh. **Asian J. Exp. Biol. Sci.**, Bangladesh, v.1, n.2, p.288-293, apr. 2010.
- RAHIMI, E. H.; SHAKERIAN, A.; FALAVARJANI, G. A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. **Comp. Clin. Pathol.**, DOI: 10.1007/s00580-011-1368-3. 2011. [On line].
- REBOUÇAS, R. H.; SOUSA, O. V.; LIMA, A. S.; VASCONCELOS, F. R.; CARVALHO, P. B.; VIEIRA, R. H. S. F. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environ. Res.**, San Diego, v.111, n.1, p.21-24, jan. 2011.
- REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Rev. Bras. Cienc. Solo**, Campinas, v.34, n.3, p.601-616, fev. 2010.
- REILLY, P. J. A.; TWIDDY, D. R.; FUCHS, R. S. Review on the occurrence of *Salmonella* in cultured tropical shrimp. **Fao Fish. Circ.**, Rome, v.851, 1992. 19p.
- RIBEIRO, R. V.; REIS, E. M. F.; REIS, C. M. F.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; RODRIGUES, D. P. Incidence and antimicrobial resistance of enteropathogens isolated from an integrated aquaculture system. **Lett. Appl. Microbiol.**, Malden, v.51, n. 6, p. 611-618, dec. 2010.
- ROCHA, I. P. Carcinicultura: Produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Rev. da ABCC**, Recife, ano 9, n.1, p.16-20, set. 2007.

_____. Brasileira: Processos tecnológicos, impactos sócio-econômicos, sustentabilidade ambiental, entraves e oportunidades. **Rev. da ABCC**, Recife, ano 13, n.1, p.26-34, jan. 2011.

RODRIGUES, D. C.; TAUXE, R. V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiol. Infect.**, New York, v.105, n.1, p.21-27, aug. 1990.

RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S.; REIS, E. M. F. **Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2007. (Manual Técnico).

RODRIGUES, D. P. Vigilância de *Salmonella*. In: _____ **Capacitação e Controle de *Salmonella*** - WHO - Global Salmonella Surveillance. Aula ministrada na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 26 set. 2005.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha - Desempenho em 2004. **Rev. da ABCC**, Recife, ano 7, n.4., p.38-44, jun. 2005.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, A. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3v.1989.

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

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v.65, n.5, p.725-759, oct. 2006.

SCHETS, F. M.; MEDEMA, G. J; HAVELAAR, A. H. Comparison of Colilert with Dutch standard enumeration methods for *Escherichia coli* and total coliforms in water. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v.17, n.1, p.17-19, jul. 1993.

SCHLUSENER, M. P.; BESTER, K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. **Environ. Pollut.**, Oxford, v.143, n.3, p.565-571, oct. 2006

SEMACE - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. Governo do Estado do Ceará. Portaria 154 de 22/07/2002. **Dispõe sobre padrões e condições para lançamento de efluentes líquidos gerados por fontes poluidoras.** Art 6º. Disponível em: <www.semace.gov.br> Acesso em: 02 mar. 2009.

SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **FAO Fish. Tech. Pap.**, Roma, v. 469, 2005. 97p.

SEYFRIED, E. E.; NEWTON, R. J.; RUBERT, K. F; PEDERSEN, J. A; MCMAHON, D. K. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. **Microb. Ecol.** Nova York, v.59, n.4, p.799-807, may. 2010.

SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; MENEZES, F. G. R.; LIMA, L. N. G. C.; NASCIMENTO, S. M. M.; CARVALHO, F. C. T. Bactérias fecais em ostras, *Crassostrea rhizophorae*. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v.36, n.1, p.63-66, 2003.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v.4, n.2, p.85-100, mai. 2002.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.844-855, jun. 2006.

SIRCILLI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de virulência I: adesão, invasão e sideroforos. *In*: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed.) **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p.143-148.

SMITH, K. P.; GEORGE, J.; CADLE, K. M.; KUMAR, S.; ARAGON, S. J.; HERNANDEZ, R. L.; JONES, S. E.; FLOYD, J. L.; VARELA, M. F. Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and genotyping of *Salmonella* enterica isolates from clinical cases of salmonellosis in New Mexico in 2008. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, New York, v.26, n.6, p.1025-1031, jun. 2010.

STEPANAUSKAS. R.; GLENN TC.; JAGOE CH, TUCKFIELD RC.; LINDELL AH, KING CJ. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. **Environ Microbiol.**, {S.L} v. 8, p.1510– 1514, ,sep. 2006

SOUSA, O. V.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CATTER, K. M.; FONTELES-FILHO, A. A.; MACRAE, A.; VIEIRA, R. H. S. F. Specificity of a defined substrate method used to monitor balneability of tropical coastal waters impacted by polluted storm water. **J. Water Health**, London, v.8, n.3, p.543-549, sep. 2010.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Rev. Ciên. Hoje**, Rio de Janeiro, v.23, n.138, p.27-35, 1998.

TAO, R.; YING, G. G.; SU, H. C.; ZHOU, H. W.; SIDHU, J. P. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. **Environ. Pollut.**, Oxford, v.158, v.6, p.2101-2109, jun. 2010.

TAVARES, W. Classificação dos antibióticos. *In*: _____. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. Edição revista e atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. cap. 2. p. 11-16.

TAVARES, W. Mecanismos de ação dos antimicrobianos. *In*: _____. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 2. ed. revista e atualizada, Editora Atheneu, São Paulo, 2009. cap. 4. p.23-35.

TÔRRES, R. C. O. *Escherichia coli*. *In*: VIEIRA, R. H. S. F (col.). **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. cap. 10, p.125-138.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

TRAFNY, E. A.; KOZLOWSKA, K.; SZPAKOWSKA, M. A novel Multiplex-PCR assay for the detection of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in human faeces. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.43, n.6, p.673-679, dec. 2006.

TURKI, Y.; OUZARI, H.; MEHRI, I.; BENAÏSSA, R.; HASSEN, A. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.45, n.2, p.940-946, mar. 2012.

- VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T.; ANDRADE, M. A. G. de; MEDEIROS, L. V. Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias indicadoras de contaminação fecal em água. **Hig. Aliment**, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 127-130, abr. 2006 .
- VAN DONSEL, D. J.; GELDREICH, E. E. Relationships of *Salmonella* to fecal coliforms in bottom sediments. **Water Res.**, Oxford, n.11, p.1079-1087, 1971.
- VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; SMITH, H.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.59, n.4, p.746-750, apr.. 2007.
- VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Sci. Vet.**, Porto Alegre, v.37, Supl 1, p.147-150, mai. 2009.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.**, New York, v.5, n.1, p.25-40, 1994.
- VIEIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, E. M. R.; CARVALHO, F. C. T.; SILVA, C. M.; SOUSA, O. V.; RODRIGUES, D. P. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. **J. Environ. Sci. Health Part B.**, Philadelphia, v.45, n.3, p.198-203, apr. 2010.
- VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, A. I. M.; SOUSA, O. V. S.; HOFER, E.; VIEIRA, G. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; LIMA, E. A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v.34, p. 43-48, 2001.
- WALLACE, H. A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. FDA/CFSAN. Sept 2005. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-4a.html>> Acesso em: 10 out. 2009.
- WANG, L.; YANG, H.; ZHANG, C.; MO, Y.; LU, X. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.619, n.1, p.54-58, jun. 2008.
- WEBSTER, L.F.; THOMPSON, B. C.; FULTON, M. H.; CHESTNUT, D. E.; VAN DOLACH, R. F.; LEIGHT, A. K.; SCOTT, G. I. Identification of source of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries uses antibiotic resistance analysis. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v.298, n.2, p.179-195, jan. 2004.
- WHEELER, E.; CANN, I. K. O.; MACKIE, R. I. Genomic fingerprinting and serotyping of *Salmonella* from Galapagos iguanas demonstrates island differences in strain diversity. **Environ. Microbiol. Rep.**, Malden, v.3, n.2, p.166–173, apr. 2011.
- WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, Washington, v.279, n.5353, p.996-997, feb. 1998.

YANG, W.; QU, D.; ZHANG, X.; SHEN, J.; CUI, S.; SHI, Y.; XI, M.; SHENG, M.; ZHI, S.; MENG, J. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.141, n.1-2, p.63-72, jun. 2010.

YATES, C. M.; PEARCE, M. C.; WOOLHOUSE, M. E. J.; AMYES, S. G. B. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.54, n.2, p.534-537, aug. 2004.

ZHANG, Y. B.; LI, Y.; SUN, X. L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.62, n.11, p.2299–2307, nov. 2011.

ZULKIFLI, Y.; ALITHEEN, N. B.; RAHA, A. R.; YEAP, S. K.; MARLINA, S. R.; NISHIBUCHI, M. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. **Intl. Food Res. J.**, Malaysia, v.16, n.1, p.53-58. 2009.