

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E PRELIMINAR DE
VIRULÊNCIA ENTRE CEPAS DE *Vibrio* spp. ISOLADAS DA ÁGUA E SEDIMENTO
DO ESTUÁRIO DO RIO ACARAÚ, CEARÁ, BRASIL

FORTALEZA
2011

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E PRELIMINAR DE
VIRULÊNCIA ENTRE CEPAS DE *Vibrio* spp. ISOLADAS DA ÁGUA E SEDIMENTO
DO ESTUÁRIO DO RIO ACARAÚ, CEARÁ, BRASIL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Microbiologia Ambiental.

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

FORTALEZA
2011

R575p Rocha, Rafael dos Santos
Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e preliminar de virulência entre cepas de *vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio acaraú, Ceará, Brasil
/ Rafael dos Santos Rocha. 2011.
85f.; il. color. enc.

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

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias / Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.

1.Vibrionaceae – Ceará. 2.Antimicrobianos. 3. Patogenicidade. I.Vieira, Regine Helena Silva dos Fernandes (Orient.) II.Universidade Federal do Ceará – Curso de Engenharia de Pesca. III.Título.

CDD 639.543

RAFAEL DOS SANTOS ROCHA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E PRELIMINAR DE
VIRULÊNCIA ENTRE CEPAS DE *Vibrio* spp. ISOLADAS DA ÁGUA E SEDIMENTO
DO ESTUÁRIO DO RIO ACARAÚ, CEARÁ, BRASIL.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca,
da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre
em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Membro Externo)
Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC

À minha avó (Dora) e à minha tia (Antônia) pelos
tempos que foram nossos (*in memoriam*) e ao
meu sobrinho Miguel por ser o renascimento da
alegria em um ano tão devastador.

DEDICO

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, pela compreensão, paciência, ajuda e por ter acreditado e me dado a oportunidade de ingressar nesta área com a qual me identifico cada dia mais: a Microbiologia. A você toda minha gratidão. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, essa força mor, a qual alicerça minha vida.

Aos meus pais, Luis Antônio Martins Rocha e Maria Socorro dos Santos Rocha, pelo carinho, afeto e paciência em mim creditados.

Ao meu irmão, Diego dos Santos Rocha, por ser acima de tudo um amigo fiel.

Aos amigos de sempre: Ana Maria Magalhães, Arthur Gonçalves Lima, Gustavo Pereira Sales, Herbert da Silva Meireles, Ísis Oliveira de Lima, Jonatas Pizzuto Almeida, Paul Lorentz Miller, Rodrigo Silveira Pezarollo e Victor Cortez Leite. Muito Obrigado!

À Carla Luciana Teixeira dos Santos, Fabiana Mesquita Marreiro, Ítala Farias Dias, Pedro Henrique Viana Araújo e Socorro Jeyce Rocha Vasconcelos pelas dificuldades, planos e conquistas divididos desde o ano em que nos encontramos na Engenharia de Pesca. Vocês fazem parte da minha vida!

Ao Francisco de Assis Brito, pela amizade e diligência, aos quais serei sempre grato.

À Lana Oliveira Leite, pelo apreço e amizade que sempre me foram sinceros.

À Lorena Pontes Colares pela amizade e meses a fio no que seria conhecido como “o início” do experimento de mestrado.

À Ludimila Maria Mendonça Conde Amorim, pela amizade crescente e ajuda incomensurável durante a etapa final do meu experimento.

À Soraya da Silva Neves, pela amizade e estímulo de competência a seguir.

Ao Fábio Roger Vasconcelos, pela amizade e ajuda sempre presente.

À Camilla Oliveira Brandão, pela ajuda no antibiograma e identificação prévia das cepas.

À Renata Albuquerque Costa, pela ajuda no desenvolvimento dos protocolos de investigação dos fatores preliminares de virulência.

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR/UFC, Alberto Jorge Gomes Araújo, Camila Silva Magalhães, Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho, Fátima Cristiane Teles de Carvalho, Francisca Gleire Rodrigues de Menezes, Gisele Cristina Silva, Izabel Kalene Serafim Sousa, Jackson Rafael Oliveira Peixoto, Karla Maria Catter Lucena, Rayza Lima Araújo, que tornaram o ambiente uma segunda casa.

À Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa, pela concessão das cepas para esse experimento e ajuda sempre a cada dúvida.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca, em especial a Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio, pela exímia dedicação à docência que me faz, a cada dia, renovar meus votos à jornada no magistério.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da UFC, pela oportunidade de aprimorar os conhecimentos no âmbito da Universidade na qual me graduei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para dedicação ao experimento.

RESUMO

O ambiente estuarino é reconhecidamente um local de aporte de águas contaminadas de diferentes fontes. O gênero *Vibrio* é encontrado, naturalmente, nesses locais, sendo relatadas, em inúmeros trabalhos científicos, cepas resistentes a antimicrobianos utilizados, rotineiramente, no tratamento médico. Foram selecionadas setenta cepas de *Vibrio* oriundas de amostras de água e sedimento do estuário do Rio Acaraú, litoral Oeste do Ceará, Brasil para o experimento. O antibiograma foi proposto em duas baterias, sendo uma com ágar Mueller-Hinton solubilizado em água destilada (MH+AD) e a outra em água do mar (MH+AM), além de ser testada a presença dos fatores de virulência proteases (caseinase, elastase e gelatinase), lipases, fosfolipases, DNases, amilases, urease e hemolisinas (β -hemólise pelo teste de Kanagawa em ágar Wagatsuma). Os antimicrobianos testados foram NAL, AMP, ATM, CFL, CIP, CLO, CTX, EST, GEN, OTC, PEN, SUT e TET. Em MH+AD, o perfil de resistência foi verificado para 47 (67,1%) cepas a PEN, 26 (37,1%) cepas a AMP e CFL, 8 (11,4%) a OTC, 6 (8,6%) a TET, 3 (4,3%) a ATM, e 1 (1,4%) a CLO, enquanto para MH+AM, 68 (97,1%) cepas foram resistentes a OTC, 67 (95,7%) a TET, 57 (81,4%) a PEN, 34 (48,6%) a CFL, 29 (41,4%) a AMP, 21 (30,0%) a EST, 20 (28,5%) a GEN, 5 (7,2%) a ATM e NAL, 3 (4,3%) a SUT e 1 (1,4%) a CIP. As cepas resistentes em MH+AD foram submetidas à cura do plasmídeo pelo agente curagênico acridine Orange. Foi verificada resistência plasmidial em 36,21% das cepas resistentes a AMP, 5,17% a ATM, 37,93% a CFL, 13,79% a OTC, 53,45% a PEN e 6,90% a TET. Por ordem de recorrência, 67 (91,42%) cepas de *Vibrio* spp. analisadas apresentam atividade da enzima urease, seguidas de 57 (81,42%) para lipase, 54 (77,14%) a amilase, 53 (75,72%) a gelatinase, 43 (61,42%) a caseinase, 26 (37,14%) a fosfolipase, 17 (24,28%) a DNase, 16 (22,86%) a elastase e 13 (18,57%) a β -hemólise (Kanagawa). A água do mar influenciou, significativamente, a caracterização da resistência das cepas de *Vibrio* spp. analisadas, principalmente, sobre os antimicrobianos das classes das tetraciclina, além de ter sido detectada múltipla resistência associada à cepas com fatores preliminares de virulência.

Palavras-Chave: Vibrionaceae. Ambiente. Antimicrobianos. Patogenicidade.

ABSTRACT

The estuarine environment is recognized as an intake of contaminated water from different sources. The genus *Vibrio* is found in those places, being reported in many papers resistant strains to antibiotics used routinely in medical treatment. Seventy strains of *Vibrio* were selected originated from samples of water and sediment from the Acaraú estuary, West coast of Ceará, Brazil to experiment. The antibiogram was proposed in two batteries, one with Mueller Hinton agar dissolved in distilled water (MH+DW) and the other in seawater (MH+SW), and is tested the presence of virulence factors protease (caseinase, elastase and gelatinase), lipases, phospholipases, DNases, amylase, urease, and hemolysin (β -hemolysis test by Kanagawa Wagatsuma agar). The antimicrobials tested were NAL, AMP, ATM, CFL, CIP, CHL, CTX, STP, GEN, OTC, PEN, TCY and STX. In MH+DW, the resistance profile was observed for 47 (67.1%) strains to PEN, 26 (37.1%) to AMP and CFL, 8 (11.4%) to OTC, 6 (8.6%) to TCY, 3 (4.3%) to ATM and 1 (1.4%) to CHL, while for MH+SW, 68 (97.1%) strains were resistant to OTC, 67 (95.7%) to TCY, 57 (81.4%) to PEN, 34 (48.6%) to CFL, 29 (41.4%) to AMP, 21 (30.0%) to STP, 20 (28.5%) to GEN, 5 (7.2%) to ATM and NAL, 3 (4.3%) to STX and 1 (1.4%) to CIP. The resistant strains in MH+DW were subjected to plasmid curing by acridine orange agent. Resistance plasmid was observed in 36.21% of resistant strains to AMP, 5.17% to ATM, 37.93% to CFL, 13.79% to OTC, 53.45% to PEN and 6.90% to TCY. By order of recurrence, 67 (91.42%) strains of *Vibrio* spp. have analyzed the enzyme urease, followed by 57 (81.42%) to lipase, 54 (77.14%) to amylase, 53 (75.72%) to gelatinase, 43 (61.42%) to caseinase, 26 (37.14%) to phospholipase, 17 (24.28%) to DNase, 16 (22.86%) to elastase and 13 (18.57%) to β -hemolysis (Kanagawa). Seawater influence significantly the characterization of the resistance of strains of *Vibrio* spp. analyzed mainly on the drugs of the tetracycline class, and has been detected multidrug resistant strains associated with preliminary virulence factors

Key words: Vibrionaceae. Environment. Antimicrobial agents. Pathogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Fluxograma do antibiograma das cepas de <i>Vibrio</i> spp.	32
Figura 2 – Percentual de cepas de <i>Vibrio</i> spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos testados no ensaio MH+AD.	41
Figura 3 – Percentual de cepas de <i>Vibrio</i> spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos testados no ensaio MH+AM.	49
Figura 4 – Halo transparente no teste da amilase.	54
Figura 5 – Halo transparente no teste da caseinase.	54
Figura 6 – Coloração rósea ao redor do inoculo no teste da DNase.	55
Figura 7 – Halo transparente no teste da elastase.	55
Figura 8 – Halo opalescente no teste da fosfolipase.	55
Figura 9 – Halo transparente no teste da gelatinase.	55
Figura 10 – Halo transparente no teste de β -hemólise de Kanagawa em ágar Wagatsuma.	55
Figura 11 – Halo opalescente no teste da lipase.	55
Figura 12 – Tubo positivo (à direita) para produção da enzima urease, com coloração rósea característica.	56

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp., por espécie e origem, selecionadas para o experimento.	28
Quadro 2 – Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antimicrobianos testados.	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE e o perfil de sensibilidade a antimicrobiano em ágar Mueller-Hinton solubilizado em água destilada e em água do mar com salinidade 20.	40
Tabela 2 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp., por espécie, isolados da água e do sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência aos antimicrobianos analisados no ensaio MH+AD.	43
Tabela 3 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência e índice de multirresistência por espécie analisada no ensaio MH+AD (MAR _D).	45
Tabela 4 – Caracterização da resistência em cepas de <i>Vibrio</i> spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE no ensaio MH+AD.	46
Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos ampicilina (AMP), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET) por espécie de <i>Vibrio</i> resistentes, no ensaio MH+AD, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.	47
Tabela 6 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp., por espécie, isolados da água e do sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência aos antimicrobianos analisados no ensaio MH+AM.	50
Tabela 7 – Número de cepas de <i>Vibrio</i> spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência e índice de multirresistência por espécie analisada no ensaio MH+AM (MAR _M).	52
Tabela 8 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos ampicilina (AMP), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET) por espécie de <i>Vibrio</i> resistentes, no ensaio MH+AM, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.	53
Tabela 9 – Perfil dos fatores preliminares de virulência das cepas de <i>Vibrio</i> spp., por espécie, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.	57

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Estuários e Manguezais	17
2.2 Antimicrobianos no meio ambiente	18
2.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos	19
2.4 Características gerais do gênero <i>Vibrio</i>	20
2.5 Patogenicidade e fatores de virulência: aspectos gerais	21
2.6 Fatores de virulência em <i>Vibrio</i> spp.	23
2.6.1 <i>Vibrio cholerae</i>	23
2.6.2 <i>Vibrio coralliilyticus</i>	24
2.6.3 <i>Vibrio harveyi</i>	24
2.6.4 <i>Vibrio mimicus</i>	25
2.6.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
2.6.6 Outras espécies do gênero <i>Vibrio</i>	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Origem das cepas	28
3.2 Verificação da pureza das cepas	28
3.2.1 Análise morfotintorial	28
3.2.2 Análise morfológica das colônias	29
3.3 Antibiograma	29
3.3.1 Ensaio com água destilada (MH+AD).....	30
3.3.1.1 Preparo da emulsão do inóculo	30
3.3.1.2 Inoculação nas placas de teste	30
3.3.1.3 Aplicação dos discos de antimicrobianos	30
3.3.1.4 Leitura dos halos e interpretação dos resultados	31
3.3.2 Ensaio com água do mar (MH+AM)	33
3.3.2.1 Preparo da água do mar com salinidade 20	33
3.4 Cura do Plasmídio	34
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	34
3.5.1 Preparo das soluções estoques dos antimicrobianos	34
3.5.1.1 Ampicilina	35
3.5.1.2 Oxitetraciclina	35
3.5.1.3 Tetraciclina	35
3.5.2 Preparo dos tubos com antimicrobianos	35
3.5.3 Preparo do inóculo	36
3.5.4 Interpretação dos resultados	36
3.6 Cálculo do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR)	36
3.7 Fatores preliminares de virulência	37
3.7.1 Amilase	37
3.7.2 β -hemólise	37
3.7.3 Caseinase	38
3.7.4 DNase	38
3.7.5 Elastase	38

3.7.6 Fosfolipase	38
3.7.7 Gelatinase	39
3.7.8 Lipase	39
3.7.9 Urease	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de água em quantidade e qualidade para os diferentes usos humanos tem sido uma preocupação mundial crescente (PIZZELLA; SOUZA, 2007). Nesse intuito, estudos recentes evidenciaram a necessidade do tratamento de efluentes gerados pelas atividades antrópicas, antes que eles sejam dispostos em receptores hídricos. Embora essas soluções visem o desenvolvimento sustentável das atividades que se utilizam de recursos hídricos, a inviabilidade econômica ainda é o principal impasse para sua concretização (BARAN; HAMBREY, 1998). Dessa forma, a avaliação do impacto no ecossistema marinho e estuarino por essas atividades deve ser investigada, a fim de se verificar os danos e a possível recuperação desses ambientes (PASSONE *et al.*, 2003).

Os sistemas estuarinos são ambientes dinâmicos, continuamente, submetidos à condição de mistura de água fluvial e marinha, ocasionada pelo efeito das marés que, dentre outros, causa alterações físico-químicas nas propriedades da água (SCHMIEGELOW, 2004). Nesses sistemas se inserem ecossistemas manguezais que são, reconhecidamente, ambientes ricos em matéria orgânica proveniente de diversas fontes e, por isso, sustentam uma elevada produtividade primária e ciclagem de nutrientes consolidando-se como um ecossistema de relevante interesse ecológico (GONI; TEIXEIRA; PERKLEY, 2003).

Mesmo que o despejo de efluentes de esgotos domésticos, industriais e de aquicultura não tenham uma correlação direta sobre a diversidade bacteriana no ecossistema manguezal, é válido que esses sobrelevam a quantidade de matéria orgânica disponível e sustentável (KEMPER, 2008).

De acordo com Barbieri *et al.* (1999), os ambientes estuarinos são reservatórios críticos para espécies bacterianas do gênero *Vibrio*. Os micro-organismos que compõem este gênero são mesófilos e tendem a proliferar em águas marinhas costeiras tropicais, onde as temperaturas são mais elevadas e atendem as suas exigências de salinidade e pH (LAKE; HUDSON; CRESSEY, 2003).

A intensificação na produção e o conseqüente aumento da densidade de estocagem, em cultivos, tem ocasionado doenças nos organismos cultivados (TENDENCIA; DE LA PEÑA, 2002). Para o combate dessas enfermidades, tem se registrado o uso indiscriminado de antimicrobianos como medida profilática (CARNEIRO *et al.*, 2007).

O uso de antimicrobianos gera inúmeros problemas, principalmente, devido à seleção de cepas bacterianas resistentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Além disso, os

relatos de estirpes bacterianas com múltipla resistência a antimicrobianos, incluindo aqueles com amplo espectro de ação, tem sido cada vez mais comuns, principalmente, em espécies de interesse clínico (NIKAIDO, 2009).

Boggard e Stobberingh (2000) ressaltam que cepas bacterianas resistentes, bem como os resíduos de antimicrobianos, podem ser carregados pelos efluentes dos viveiros para rios e estuários e, uma vez presentes nesses ambientes, essas cepas podem favorecer a disseminação da resistência.

Segundo Courvalin (1994), a transferência de genes que codificam resistência a antimicrobianos pode ocorrer tanto em bactérias do mesmo gênero, como em gêneros diferentes, independentemente, de serem Gram positivas ou negativas. Ademais, elementos genéticos móveis, tais como plasmídios são, normalmente, associados à disseminação da resistência bacteriana e, por isso, a caracterização da resistência como plasmidial é um problema de saúde pública (BENNETT, 2008).

Outro fator de extrema importância é o tempo de residência dos antimicrobianos no ambiente. Embora alguns estudos relatem a presença residual dessas drogas no ambiente marinho, atualmente, são conhecidos os efeitos dos íons presentes na água do mar, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , sobre a inativação de alguns antimicrobianos, principalmente, da classe das tetraciclina (TORKILDSEN *et al.*, 2000).

Algumas espécies do gênero *Vibrio* são, normalmente, associadas a bacterioses em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*), embora o seu potencial patogênico não seja completamente esclarecido. Dentre os patógenos mais comumente associados a doenças ao homem e em peneídeos estão *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* (AUSTIN; ZHANG, 2006).

No ambiente marinho, a presença de cepas com potencial patogênico não é comum, embora recentes trabalhos demonstrem o contrário (AUSTIN; AUSTIN, 2007; CANO-GOMEZ *et al.*, 2009). Vários casos de diarreia e doenças sistêmicas estão relacionados ao gênero *Vibrio* como agentes etiológicos. Esses casos ocorrem principalmente em países que adotam o hábito de consumir alimentos crus ou parcialmente cozidos (ABBOTT; JANDA, 1994).

A virulência de *Vibrio* spp. é normalmente associada à presença de produtos extracelulares (PEC's) tais como proteases, fosfolipases, hemolisinas e citotoxinas (AUSTIN; ZHANG, 2006; LIU; LEE; CHEN, 1996; LEE *et al.*, 1997). A produção desses fatores varia entre os isolados e considera-se que podem ser compartilhados com outras bactérias através de elementos genéticos móveis (PIZZUTO; HIRST, 1995).

Embora uma cepa bacteriana apresente múltipla resistência, essa característica não lhe confere virulência, porém cepas bacterianas que apresentem as características de serem altamente virulentas e resistentes a diferentes classes de antimicrobianos representam risco potencial, principalmente, se forem de origem ambiental, pois o controle na disseminação se torna impraticável (KEMPER, 2008; NWOSU, 2001).

Com base nessas informações, o presente estudo teve o objetivo geral de estabelecer o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de diferentes classes entre 70 cepas de *Vibrio* spp. isoladas do estuário do Rio Acaraú em meio preparado com água destilada e com água marinha e em um seguinte passo, verificar a presença, ou não, de fatores preliminares de virulência e os seguintes objetivos específicos:

- I. Caracterizar a origem da resistência como cromossômica ou plasmidial;
- II. Verificar a influência da água do mar na atividade antimicrobiana frente a cepas de *Vibrio* spp.;
- III. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos para as cepas resistentes à ampicilina, oxitetraciclina e tetraciclina;
- IV. Avaliar, preliminarmente, a presença de fatores de virulência das 70 cepas de *Vibrio* analisadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estuários e manguezais

Os estuários podem ser definidos, geograficamente, como uma região costeira parcialmente fechada, no qual a água doce de um rio e a água do mar encontram-se e se misturam sendo, portanto, um ambiente de amplas variações físico-químicas. Tais regiões estão sujeitas à forte influência da bacia de drenagem do rio e possuem, em regiões equatoriais um ecossistema manguezal acoplado (SCHMIEGELOW, 2004).

Os manguezais são biomas que se estendem desde a Ásia à Austrália, no Pacífico, até as Américas Central e do Sul. A vegetação predominante, denominada mangue, apresenta uma distribuição limitada às coordenadas 25°N e 25°S (LOURENÇO; MARQUES JÚNIOR, 2002). Ocorrem em áreas sujeitas à ação de marés, com predominância de solo argiloso e se caracterizam como biomas de interface, sendo compostos pelas misturas de águas de drenagem continentais e oceânicas (BARBOSA, 2000). Assim, os manguezais participam de uma unidade geomorfológica singular, na qual o relevo plano facilita a deposição de sedimentos de limo e argila, que entram na composição do substrato (FERNANDES, 2006).

No Brasil, os manguezais estendem-se desde Santa Catarina (latitude 28°53'S) até o Amapá (latitude 04°30' N), no Cabo Orange (HERZ, 1991; LACERDA, 1999), e os maiores encontram-se no Piauí e no Amapá (AB'SABER, 1990). Os manguezais brasileiros ocupam uma área de aproximadamente 25 mil km² ao longo de 6.786 km de linha de costa (SCHAFFER-NOVELLI; CITRÓN-MOLERO, 1994). A maior parte deles, cerca de 85%, encontra-se no litoral norte do país, nos estados do Amapá, Pará e Maranhão, e o limite mais oriental localiza-se na ilha oceânica de Fernando de Noronha, em uma área de 0,15 ha (LACERDA, 1999). Os manguezais cearenses se distribuem ao longo de treze rios litorâneos, dos quais se destacam o Timonha, Coreaú, Acaraú, Zumbi e Jaguaribe.

Igbinsa e Okoh (2008) afirmam que o aumento do aporte de nutrientes, devido ao crescimento urbano e industrial, é um dos principais fatores para poluição desses ambientes, principalmente, pelas atividades que demandam grande quantidade de água.

Barros *et al.* (2000) apontam como principais fatores causadores de alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos manguezais o desmatamento, queimadas, deposição de lixo, lançamentos de esgoto e efluentes industriais, dragagens, construções de

marinas, pesca predatória e aquicultura. Dentre estes, o destaque é a atividade de aquicultura que descarta grande quantidade de efluentes não tratados para os corpos hídricos (JONES; DENNISON; PRESTON, 2001).

Segundo Torsvik, Sorheim e Goksoyr (1996), a diversidade da comunidade bacteriana nessas regiões pode sofrer o efeito da poluição orgânica gerada pelos efluentes. Nesse contexto, a avaliação dos grupos bacterianos presentes nos estuários é necessária para avaliar o possível impacto da descarga de efluentes.

2.2. Antimicrobianos no meio ambiente

Os antimicrobianos classificam-se em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Destes, os antibacterianos são divididos em antibióticos, sintetizados por fungos, e quimioterápicos, produzidos em laboratório. Os primeiros ainda predominam, mas, frequentemente, são manipulados quimicamente (semi-sintéticos) (DEL MAR, 2000). A indicação de antimicrobianos prevalece na prática clínica diária, independentemente da origem natural ou sintética (DEPARDIEU *et al.*, 2007).

As características do antimicrobiano ideal são: (a) ter atividade sobre amplo espectro de micro-organismos; (b) ser absorvido por via oral e parental; (c) ter fácil distribuição pelos tecidos e líquidos orgânicos, atingindo concentração bactericida; (d) não sofrer destruição por enzimas tissulares; (e) não provocar efeitos irritantes, tóxicos ou alérgicos no hospedeiro; (f) não induzir o desenvolvimento de estirpes resistentes; (g) não provocar diminuição da resistência do organismo do hospedeiro; (h) não ter efeitos teratogênicos; (i) produzir concentrações elevadas e por tempo prolongado e (j) ser facilmente obtido em escala industrial e a baixo custo (TAVARES, 2001).

Os antimicrobianos podem agir sobre bactérias interrompendo seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático) e/ou induzindo à morte bacteriana (efeito bactericida, bacteriolítico) (CHOPRA; ROBERTS; 2001). Esses efeitos ocorrem através da interferência sobre as vias metabólicas, alterando desde a permeabilidade (membrana externa) até a síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) bacteriana (PAGES, 2004).

Após a administração, os antimicrobianos para uso humano e veterinário ou seus metabólitos são excretados no efluente e atingem a estação de tratamento de esgoto (ETE). A fração não-metabolizada é excretada como um composto inerte ou ainda ativo

(KUMMERER; HENNIGER, 2003). Quantidades residuais podem atingir águas superficiais, subterrâneas ou ficarem aderidas ao sedimento (BATT; AGA, 2005).

Embora a maioria dos estudos sobre bactérias resistentes tenha foco, principalmente, em bovinos, aves e suínos, a emergência de amostras resistentes a antimicrobianos tem sido pesquisada em sistemas aquícolas tropicais, pelo fato de compostos antimicrobianos serem, indiscriminadamente, utilizados para tratamento e profilaxia de enfermidades em aquicultura (HATHA *et al.*, 2005).

Hölmstrom *et al.* (2003) relatam que o uso profilático de antimicrobianos na aquicultura tem se tornado comum, principalmente em países em desenvolvimento como a Tailândia. Os antibióticos mais utilizados pelos produtores na Ásia são norfloxacina, oxitetraciclina, enrofloxacina e sulfonamidas, que também são empregados na terapêutica humana. No Reino Unido, os antibióticos aprovados para uso em pisciculturas são oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina e co-trimazina, porém, é recomendado um período mínimo de retirada da medicação antes do abate (ALDERMAN; HASTINGS, 1998).

No Brasil, apesar de não haver levantamentos sobre o uso de antimicrobianos, as substâncias mais comumente encontradas no ambiente são oxitetraciclina, sulfa/trimetoprim e norfloxacina (BILA; DEZOTTI, 2003). A aplicação destas drogas nos viveiros de cultivo não é apenas cara, mas também prejudicial agindo, por exemplo, na seleção de bactérias que são resistentes às drogas ou estirpes mais virulentas e levando resíduos aos produtos destinados ao consumo (DECAMP; MORIARTY, 2005).

2.3. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

Quanto à origem, a resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser classificada como natural ou adquirida (LEVY, 1998). Resistência natural, também dita intrínseca, está associada ao cromossomo da bactéria. Esta resistência é, por conseguinte, uma característica transmitida, verticalmente, às bactérias descendentes, normalmente, associada à autodefesa e competição do micro-organismo (MURRAY; MOELLERING, 1978).

A resistência natural não apresenta um significado clínico relevante, já que se conhecendo o espectro de ação do antimicrobiano pode-se evitar seu uso frente a um determinado micro-organismo. Em contrapartida, a resistência adquirida é responsável por problemas médicos importantes, tendo em vista a ampla participação de micro-organismos

com sensibilidade modificada aos antimicrobianos na etiologia das infecções (ROLAIN; RAOULT, 2005). A resistência bacteriana adquirida, a um ou mais antimicrobianos pertencentes a famílias diferentes (múltipla resistência), consiste em uma característica nova, que é exibida por alguma célula da população de uma determinada espécie de bactéria. Dessa forma, estes exemplares modificados da população bacteriana não respondem mais à ação de antimicrobianos (LEVY, 1998).

Os principais mecanismos de resistência em bactérias são: (a) diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antimicrobiano, (b) destruição ou modificação do antimicrobiano e (c) alteração do sítio-alvo do antimicrobiano (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Algumas cepas bacterianas são produtoras de enzimas β -lactamases de espectro expandido (ESBL) que clivam o anel β -lactâmico de antimicrobianos que o possuem, inativando-os. O uso de inibidores destas enzimas, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam tem sido eficiente no tratamento clínico destas cepas produtoras de ESBL, pelos antimicrobianos β -lactâmicos (TAVARES, 2001).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado níveis elevados de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos em ambientes impactados pela atividade aquícola (FURUSHITA *et al.*, 2005, REBOUÇAS *et al.*, 2011; TENDENCIA; DE LA PEÑA, 2002). Estas informações são essenciais para avaliação do impacto dessa atividade sobre o ecossistema marinho e estuarino.

2.4. Características gerais do gênero *Vibrio*

O primeiro relato de *Vibrio* data de 1854 pelo anatomista italiano Filippo Pacini, porém seu trabalho teve pouca relevância científica devido à aceitação, na época, da teoria de miasmas como causadores de doenças (BENTIVOGLIO; PACINI, 1995). Somente em 1883 o naturalista alemão Robert Koch, em expedição ao Egito, conseguiu isolar e caracterizar a bactéria como agente causador da cólera. O trabalho de Koch, mesmo independente dos resultados de Pacini, adquiriu maior notoriedade e a bactéria isolada fora denominada, em última revisão taxonômica, *Vibrio cholerae*.

Atualmente, o gênero *Vibrio* consta de 94 espécies, com representantes isolados de amostras clínicas e ambientais (DSMZ, 2011). Segundo Farmer III *et al.* (2005), os micro-

organismos pertencentes a esse gênero se caracterizam por serem curvados, ou ligeiramente curvados, com o diâmetro variando entre 0,5 e 0,8 μm e comprimento entre 1,4 e 2,6 μm . Possuem a capacidade de usar a glicose sem produção de gás e, em quase em sua totalidade, são oxidase positivos, à exceção de *V. metschnikovii*. São halófilos restritos, necessitando de sódio para o seu crescimento e desenvolvimento.

Esses micro-organismos crescem, naturalmente, em estuários e ambientes marinhos no mundo inteiro e são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas com elevada salinidade e temperatura variando de 10 a 30°C (MURRAY, 2004).

Embora sejam reconhecidamente patógenos humanos, algumas espécies pertencentes a esse gênero desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes nos ambientes aquáticos através do transporte de matéria orgânica dissolvida (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Outras espécies estão relacionadas à degradação de compostos aromáticos, tendo, portanto, extremo interesse biotecnológico (HEDLUND; STALEY, 2001).

2.5. Patogenicidade e fatores de virulência: aspectos gerais

Por muito tempo os estudos em microbiologia estiveram restritos aos micro-organismos causadores de doenças em humanos (DEPAOLA; CAPERS; ALEXANDER, 1994). Embora nos últimos anos as pesquisas tenham se diversificado para bactérias isoladas do ambiente e alimentos, aquelas de importância clínica são, ainda, as que se tem maiores dados de virulência (PAYNE; OAKLEY; OWENS, 2004).

Basicamente, a patogenicidade é mediada pela habilidade do micro-organismo para invadir, aderir-se e colonizar tecidos e órgãos do hospedeiro. Dessa forma, é resultante da interação específica entre este e o hospedeiro e sua possível capacidade para causar infecção (MURRAY, 2004).

Porém, alguns micro-organismos podem causar doenças, mesmo que não lesem diretamente os tecidos do organismo hospedeiro. Esses patógenos podem invadir e infectar por meio de várias vias, denominadas portas de entrada, tais como as membranas mucosas (trato respiratório, gastrintestinal e geniturinário), pele e via parenteral de humanos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Inúmeros autores consideram que a patogenicidade de uma bactéria ao hospedeiro seja intensificada pela presença de fatores que contribuam para invasão e/ou lesão. Estes fatores são denominados fatores de virulência, os quais podem ser utilizados para avaliar o grau em que um micro-organismo possa ser patogênico ao hospedeiro (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Dentre os principais fatores de virulência é possível destacar os fatores tóxicos (exotoxinas, enterotoxinas e endotoxinas); fatores enzimáticos (lisinas, proteases, lipases, hemolisinas, coagulase, collagenase, lecitinase, DNase, condroitinase, elastase, amilase, urease); fatores de colonização (fimbrias, biofilmes, cápsulas, adesinas, antígenos de aderência, cisteína sérica, sideróforos) e citotoxinas, dentre outros (AGUIRRE-GUZMÁN; RUÍZ; ASCENIO, 2004; BAFFONE *et al.*, 2001).

O advento de técnicas moleculares, que se baseiam na amplificação e detecção de sequências de DNA específicas, permitiram um maior entendimento acerca da patogenicidade bacteriana (AUSTIN; ZHANG, 2006). Embora esse avanço tenha sido notável, o uso de técnicas de microbiologia clássica são imprescindíveis, pois a detecção de um gene não garante que o mesmo seja expresso pelo micro-organismo, dado o grau de especificidade entre este e o hospedeiro (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Nesse contexto, os ensaios *in vivo* são importantes para confirmação da patogenicidade de um micro-organismo, sendo qualquer outro fator, isolado, apenas considerado preliminar de virulência (INTARAPRASONG *et al.*, 2009).

Entretanto, se apenas alguns micro-organismos invadirem o hospedeiro, provavelmente, serão vencidos pelas suas defesas imunológicas. Dessa forma, a virulência de um micro-organismo é, frequentemente, expressa pela dose infectante para 50% das amostras de uma população (DI₅₀). Os valores de DI₅₀ são, portanto, específicos entre as diferentes interações micro-organismo-hospedeiro (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os micro-organismos que vencem as defesas imunitárias do hospedeiro, normalmente, lesam suas células por quatro vias: (1) pelo uso de seus nutrientes, (2) causando lesão direta às vizinhanças imediatas à invasão, (3) pela produção de toxinas (endotoxinas, enterotoxinas e exotoxinas) e (4) induzindo reações de hipersensibilidade. Dentre estas, a produção de toxinas são as mais estudadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005)

Acredita-se que os plasmídios podem transportar as informações que determinam a patogenicidade de um micro-organismo (BAI *et al.*, 2008). Alguns fatores de virulência que são codificados por genes plasmidiais são a tetanospasmina (neurotoxina de *Clostridium tetani*), enterotoxina termolábil (*Clostridium botulinum*) e enterotoxina estafilocócica.

2.6. Fatores de virulência em *Vibrio* spp.

O *Vibrio cholerae* constitui-se a espécie bacteriana do gênero *Vibrio* com maiores estudos acerca de sua patogenicidade em humanos. Porém, desde que foi descoberta, a crescente confirmação de outras espécies do gênero causadoras de doenças em humanos e/ou organismos cultivados tem sido relatada (HOSSEINI *et al.*, 2004).

Além de *V. cholerae*, outras espécies comumente relacionadas a infecções são *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Estas espécies têm sido descritas como patógenos emergenciais, devido à alta virulência de algumas cepas (BAFFONE *et al.*, 2005). A patogenicidade de outros vibrios, como *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. diabolicus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus*, também é motivo de preocupação e foco de recentes pesquisas (AUSTIN; AUSTIN, 2007; HOSSEINI *et al.*, 2004).

2.6.1. *Vibrio cholerae*

A cólera é uma infecção intestinal aguda causada pelo *Vibrio cholerae*, que é uma bactéria capaz de produzir uma enterotoxina que causa diarreia. Apenas dois sorogrupos dessa bactéria são produtores da enterotoxina, o *V. cholerae* O1 (biotipos "clássico" e "El Tor") e o *V. cholerae* O139. O *V. cholerae* é transmitido principalmente através da ingestão de água ou de alimentos contaminados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A patogenia de *V. cholerae* depende da produção de dois fatores de virulência principais: (i) o pelo co-regulador da toxina (TCP), um fator de colonização, e (ii) a toxina da cólera (CT), uma enterotoxina (DAVIS; WALDOR, 2003; FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998). Todas as cepas de *V. cholerae* capazes de causar a cólera carregam o gene *tcp*, que codifica o TCP, o qual coordena a produção de CT. Uma vez a bactéria estabelecida, a potente enterotoxina leva ao aumento da secreção de eletrólitos e água no lúmen do intestino e é responsável pela severa diarreia característica da cólera (GOEL *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 1999). Além desses, existem outros genes que determinam fatores de virulência, dentre eles estão o gene *zot*, que codifica a toxina da zônula de oclusão e o *rfbO1*

que codifica o antígeno O, determinando se a cepa é do tipo O1. Os genes *rfb* contêm todas as informações necessárias para a síntese dos componentes do antígeno O, sua tradução e direcionamento à superfície da célula (MANNING *et al.*, 1995).

O gene *zot* codifica uma toxina secretada pelo *V. cholerae* que afeta a estrutura da junção de oclusão ou zônula de oclusão (tipo de junção intercelular) causando destruição reversível e criando condições para a entrada do patógeno no estroma, aumentando, assim, a permeabilidade da mucosa do intestino delgado (FASANO, 1991).

2.6.2. *Vibrio coralliilyticus*

Esta espécie foi, recentemente, descoberta como um micro-organismo associado ao branqueamento em corais da espécie *Pocillopora damicornis*, no Oceano Índico (BEN-HAIM *et al.*, 2003). Trata-se de uma bactéria extremamente dependente de temperatura para o crescimento, com relatos de casos já conhecidos em bancos de corais da costa brasileira (ALVES JUNIOR *et al.*, 2010; BEN-HAIM; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, 2003).

Pouco se sabe sobre o potencial patogênico dessa bactéria, porém Meron *et al.* (2009) consideram a presença do flagelo um importante mediador na invasão e, consequente, colonização de corais. Alguns autores sugerem que esse micro-organismo seja um patógeno restrito ao coral *Pocillopora damicornis* (CERVINO *et al.*, 2004; VIZCAINO *et al.*, 2010).

2.6.3. *Vibrio harveyi*

Essa espécie luminescente, amplamente distribuída no ambiente marinho, tem sido relatada como um patógeno primário de camarões peneídeos cultivados, especialmente na América do Sul e Ásia (ALVAREZ *et al.*, 1998; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1996; VANDENBERGUE *et al.*, 1998). Além disso, tem sido associada a doenças em peixes (HISPANO; NEBRA; BLANCH, 1997) e ostras (PASS; DYBDAHL; MANNION, 1987; VIEIRA *et al.*, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre seus mecanismos de patogenicidade.

Liu, Lee e Chen (1996) consideram as proteases, fosfolipases e hemolisinas os principais fatores virulência que lhe conferem patogenicidade. Outros autores relatam a cisteína protease de *V. harveyi* como uma importante exotoxina relacionada à patogenia em camarões peneídeos (LEE *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997).

Montero e Austin (1999) sugeriram que a toxina letal de *V. harveyi* para camarões peneídeos seria de natureza lipopolissacarídica. Já Zhong *et al.*(2006) relataram que uma hemolisina do produto extracelular de *V. harveyi* estaria envolvida na patogênese em salmonídeos. Resultados semelhantes foram encontrados por Intaraprasong *et al.* (2009), ao detectarem a virulência por conversão lisogênica.

Em geral, hemolisinas bacterianas têm sido sugeridas como importantes fatores de virulência em *Vibrio*, causando desde diarréia à septicemias hemorrágicas em seres humanos (ZHONG *et al.*, 2006,).

2.6.4. *Vibrio mimicus*

Esse micro-organismo é um patógeno humano, intimamente relacionado ao *V. cholerae* não O1, sendo considerado um agente etiológico de surtos de intoxicação alimentar devido ao consumo de pescado cru ou mal cozido (DAVIS *et al.*, 1981; SHAH; DEOKULE, 2006; SHANDERA *et al.*, 1983).

Embora uma série de fatores extracelulares sejam produzidos pela bactéria, a hemolisina de *V. mimicus* (VMH) se destaca por possuir atividades tanto hemolítica quanto enterotóxica (CHOWDHURY; MIYOSHI; SHINODA; 1990; SHI *et al.*, 1998; SULTAN; MIYOSHI; SHINODA, 2007). Lee *et al.* (1997) relatam outros fatores de virulência, tais como fosfolipases, hemaglutinias e proteases como relacionados à patogenicidade em humanos.

Rahman *et al.* (1997) relatam uma homologia de 76% entre o gene precursor de VMH e o gene precursor da toxina enterotóxica, *hlyA*, por *V. cholerae* biótipo El Tor. Shinoda *et al.* (2004) relacionam a presença de VMH tanto em cepas de origem clínica quanto ambiente.

2.6.5. *Vibrio parahaemolyticus*

O primeiro relato de infecção por *V. parahaemolyticus* ocorreu em 1951, no Japão, devido a um surto envolvendo sardinha semi-seca (conhecida como *shirasu*) não cozida. Desde então, essa bactéria tem sido apontada como a principal causa de intoxicação alimentar em Taiwan e no Japão (CHAO *et al.*, 2009). No Brasil, o primeiro relato de cepas desse micro-organismo, potencialmente virulentas, foi realizado por Hofer *et al.* (1983) no município de Cascavel, Ceará.

A virulência desse micro-organismo tem sido associada ao fenômeno Kanagawa (KP), que se caracteriza pela β -hemólise em meio ágar Wagatsuma, comum em amostras clínicas (MIYAMOTO *et al.*, 1969). Acredita-se que este fenômeno seja induzido pela hemolisina termoestável direta (TDH), codificada pelo gene *tdh* (NISHIBUCHI *et al.*, 1992). Outra hemolisina termoestável, conhecida como hemolisina termoestável relacionada (TRH), codificada pelo gene *trh*, tem sido descrita em cepas de *V. parahaemolyticus* KP negativas por desempenhar um papel importante na causa de diarreias (HONDA *et al.*, 1987; HONDA; NI; MIWATANI, 1988).

A produção de urease que, até então, não era associada a cepas de *V. parahaemolyticus*, foi relatada em 7,5% dos isolados clínicos na Tailândia, dos quais a maioria apresentou os genes *tdh* e *trh*. Suthienkul *et al.* (1996) sugerem que a produção dessa enzima, associada à presença do gene *tdh*, sejam usados como marcadores de virulência em *V. parahaemolyticus*.

Mais de 90% dos isolados clínicos de *V. parahaemolyticus* possuem a hemolisina TDH (DE PAOLA *et al.*, 1990; DEPAOLA *et al.*, 2000; KAYSNER *et al.*, 1990; WONG *et al.*, 2000). Em contraste, os genes *tdh* e *trh* são pouco relatados em cepas ambientais (SHIRAI *et al.*, 1990; KISHISHITA *et al.*, 1992). Honda e Lida (1993) acreditam que, no ambiente, cerca de 1 a 2% das cepas de *V. parahaemolyticus* apresentem os marcadores que lhe conferem virulência.

A presença desse micro-organismo em animais cultivados, principalmente em ostras, tem sido relatada a presença em recentes trabalhos (MATSUMOTO *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2010). O grande problema desses alimentos é devido ao fato de serem consumidos crus ou por não passarem por um processo de cocção adequado. Dessa forma, ostras, sushis, ou quaisquer pratos prontos para o consumo cru representam riscos por serem veículos potenciais de *V. parahaemolyticus*.

2.6.6. Outras espécies de *Vibrio*

Poucos estudos têm evidenciado a presença de fatores de virulência nas espécies *V. calviensis*, *V. diabolicus*, *V. fortis*, *V. gigantis*, *V. litoralis*, *V. ruber* e *V. rumoiensis*, embora sua detecção seja cada vez mais comum em ambientes de cultivo de organismos marinhos (MENEZES, 2005; VIEIRA *et al.*, 2010). Em contrapartida, já é conhecido o efeito da protease de *V. proteolyticus* sobre o microcrustáceo *Artemia* sp., embora não haja relatos do seu potencial patogênicos em seres humanos e organismos cultivados (MORENO; LANDGRAF; 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das cepas

Foram selecionadas 70 cepas de *Vibrio* spp., previamente identificadas com base na chave bioquímica de Nogueroles e Blanch (2008), e estocadas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC (Quadro 1). As cepas foram isoladas da água e do sedimento do Estuário do rio Acaraú em janeiro de 2009.

Quadro 1 – Número de cepas de *Vibrio* spp., por espécie e origem, selecionadas para o experimento.

Espécies	Origem		Total
	Água	Sedimento	
<i>Vibrio calviensis</i>	1	0	1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2	3
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	10	8	18
<i>Vibrio diabolicus</i>	1	2	3
<i>Vibrio fortis</i>	0	1	1
<i>Vibrio gigantis</i>	1	0	1
<i>Vibrio harveyi</i>	0	1	1
<i>Vibrio littoralis</i>	1	0	1
<i>Vibrio logei</i>	1	0	1
<i>Vibrio mimicus</i>	13	19	32
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	0	2
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2	2	2
<i>Vibrio ruber</i>	0	1	1
<i>Vibrio rumoiensis</i>	0	1	1
Total	33	37	70

3.2. Verificação da pureza das cepas

3.2.1. Análise morfotintorial

De cada cepa selecionada, foi retirada uma porção do inóculo e semeada em tubos contendo ágar tripticase soja acrescido de 1% de cloreto de sódio (p/v) (TSA 1%) (Difco). O material renovado foi incubado a 35°C por 24 h em estufa bacteriológica (Fanem). Após esse período, foi realizada a análise morfotintorial de Gram como descrito por Tortora; Funke; Case (2005). As cepas que se apresentaram como células Gram-negativas, na forma de bastonetes ligeiramente curvados, foram consideradas do gênero *Vibrio*.

3.2.2. Análise morfológica das colônias

As 70 cepas do gênero *Vibrio*, na análise morfotintorial, foram semeadas em tubos contendo água peptonada alcalina acrescida de 1% de cloreto de sódio (p/v) (APA 1%). O material renovado foi incubado a 35°C por 24 h em estufa bacteriológica. Posteriormente, uma porção do material crescido foi estriado em placas contendo ágar tiosulfato citrato bile e sacarose (TCBS) (Difco), com o auxílio de uma alça de níquel - cromo, e incubadas a 35°C por 24 h. Para cada cepa, foi avaliada a disposição e uniformidade do tamanho das colônias crescidas no ágar TCBS, o uso ou não da sacarose presente no meio (sacarose positivas ou sacarose negativas) e comparado aos resultados obtidos na identificação prévia. As cepas que apresentaram resultados similares aos originais foram consideradas puras.

3.3. Antibiograma

O antibiograma das cepas de *Vibrio* spp. purificadas foi realizado segundo as recomendações do *Clinical Laboratory and Standards Institute* na 20ª edição do *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests* (CLSI, 2010). O procedimento foi realizado utilizando-se ágar Mueller-Hinton (Difco) diluído em água destilada (ensaio MH+AD) e em água do mar (ensaio MH+AM). Foram utilizadas as cepas-padrão de *Vibrio cholerae* clássico 516B e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controles no teste.

3.3.1. Ensaio com água destilada (MH+AD)

3.3.1.1. Preparo da emulsão do Inóculo

De culturas crescidas em TSA 1% a 35°C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em 9 mL de solução salina 1 % de cloreto de sódio (p/v) (Vetec) até se obter uma turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de MacFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal), sendo considerado o intervalo entre 0,08 e 0,10, em um comprimento de onda de 625 nm. A turbidez óptica comparável a solução padrão 0,5 de MacFarland equivale a uma suspensão contendo, aproximadamente, 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL) (CLSI, 2010) (Figura 1).

3.3.1.2. Inoculação nas placas de teste

Das emulsões com turbidez ajustada, foram inoculadas, em duplicata, em placas contendo ágar Mueller-Hinton acrescido de 1% de cloreto de sódio (p/v), solubilizado em água destilada, com auxílio de um *swab* de algodão estéril. As placas foram mantidas fechadas e os discos de antimicrobianos depositados em um período não superior a 15 min. após inoculação (CLSI, 2010) (Figura 1).

3.3.1.3. Aplicação dos discos de antimicrobianos

Foi testada a susceptibilidade das cepas de *Vibrio* aos antimicrobianos (Laborclin) das classes: **aminoglicosídeos**, estreptomicina 10 µg (EST) e gentamicina 10 µg (GEN); **cefalosporinas**, cefalotina 30 µg (CFL), cefotaxima 30 µg (CTX) e ceftriaxona 30 µg (CRO); **fenicóis**, cloranfenicol 30 µg (CLO); **fluorquinolonas**, ciprofloxacina 5 µg (CIP); **monobactâmicos**, aztreonam 30 µg (ATM); **penicilinas**, ampicilina 10 µg (AMP) e penicilina 10 U (PEN); **quinolonas**, ácido nalidíxico 30 µg (NAL); **sulfonamidas**,

sulfazotrim 25 µg (SUT) e **tetraciclina**s, tetraciclina 30 µg (TET). Além desses, foi testada a susceptibilidade antimicrobiana à oxitetraciclina 30 µg (OTC) (Des-Far), sendo confeccionados os discos conforme recomendações do CLSI (2010). Os discos de antimicrobianos foram depositados, individualmente, com auxílio de uma pinça estéril na superfície do ágar. Posteriormente à aplicação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 24 h (CLSI, 2010) (Figura 1).

3.3.1.4. Leitura dos halos e interpretação dos resultados

Após o período de incubação, cada placa foi examinada a fim de verificar se foi satisfatoriamente semeada. A formação de halos, uniformemente circulares, e a presença de um tapete confluyente de crescimento indicaram a inoculação correta. Os halos de inibição total foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. De acordo com o tamanho de cada halo, a cepa foi classificada como sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado. O padrão interpretativo do tamanho dos halos, para cada antimicrobiano testado, está detalhado no quadro 2 (CLSI, 2010).

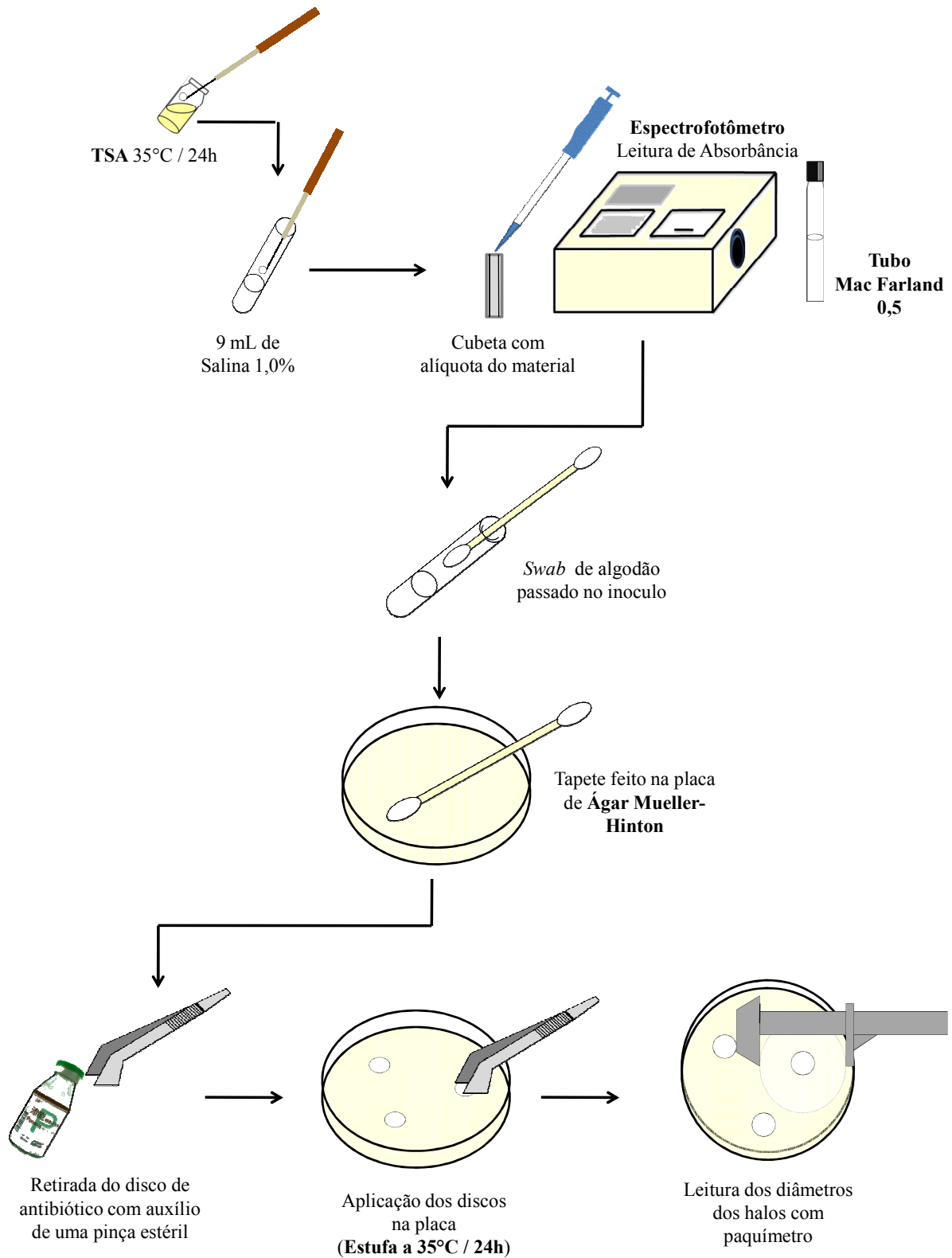


Figura 1 – Fluxograma do antibiograma das cepas de *Vibrio* spp.

Quadro 2 – Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	Símbolo	Conc. disco*	Zona de Inibição (mm)			Micro-organismo de Referência
			Sensível	Intermediário	Resistente	
Ampicilina	AMP	10 µg	≥ 17	14 - 16	≤ 13	<i>Vibrio cholerae</i>
Aztreonam	ATM	30 µg	≥ 21	18 - 20	≤ 17	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cefalotina	CFL	30 µg	≥ 18	15 - 17	≤ 14	<i>Enterobacteriaceae</i>
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≥ 21	16 - 20	≤ 15	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cloranfenicol	CLO	30 µg	> 18	13 - 17	≤ 12	<i>Vibrio cholerae</i>
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≥ 23	20 - 22	≤ 19	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cefotaxima	CTX	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22	<i>Enterobacteriaceae</i>
Estreptomicina	EST	10 µg	≥ 15	12 - 14	≤ 11	<i>Enterobacteriaceae</i>
Gentamicina	GEN	10 µg	≥ 15	13 - 14	≤ 12	<i>Enterobacteriaceae</i>
Ácido nalidíxico	NAL	30 µg	≥ 19	14 - 18	≤ 13	<i>Enterobacteriaceae</i>
Oxitetraciclina	OTC	30 µg	> 19	15 - 18	≤ 14	<i>Enterobacteriaceae</i>
Penicilina	PEN	10 U	≥ 15	–	≤ 14	<i>Enterococcus</i>
Sulfazotrim	SUT	25 µg	≥ 16	11 - 15	≤ 10	<i>Vibrio cholerae</i>
Tetraciclina	TET	30 µg	> 19	15 - 18	≤ 14	<i>Vibrio cholerae</i>

Fonte: CLSI, 2010

*Conc. disco = concentração do disco

3.3.2. Ensaio com água do mar (MH+AM)

3.3.2.1. Preparo da água do mar com salinidade 20

A água, recém coletada em alto mar na costa de Fortaleza, foi filtrada, inicialmente, em papel de filtro de 110 mm (Whatman), seguido de filtração a vácuo com uso do *kit* de filtração com membrana de 0,22 µm de poro (Biosystems). Após, foi transferida para garrafas de vidro, previamente esterilizadas, com capacidade para 1 L. A salinidade foi aferida em refratômetro (Micronal) e ajustada, por diluição simples em água destilada, até se obter uma salinidade final de 20. Antes do uso, a água com salinidade ajustada, foi autoclavada a 121°C por 15 min. O antibiograma foi realizado segundo procedimento descrito no item 3.3.1, porém com a solubilização do ágar Mueller-Hinton na água do mar com salinidade 20.

3.4. Cura do plasmídio

As cepas de *Vibrio* spp. caracterizadas como resistentes aos antimicrobianos testados foram submetidas à cura do plasmídio pelo agente curagênico acridine orange (Sigma), de forma a se verificar a natureza da resistência como potencialmente cromossômica ou plasmidial (MOLINA-AJA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2010). Culturas puras foram semeadas em tubos contendo caldo Luria Bertani 1% de NaCl (p/v) (LB 1%) acrescido de 100 µg / mL de acridine orange e LB 1% sem adição do agente curagênico (controle), e incubadas a 35°C por 24 h. Após este período, as cepas foram inoculadas em tubos com TSA 1% e incubadas a 35°C por 24 h. O antibiograma das cepas resistentes foi realizado segundo procedimento descrito no item 3.3.1. Caso as cepas permanecessem resistentes ao antimicrobiano testado, essa resistência seria caracterizada como potencialmente cromossomial, ao contrário, plasmidial.

3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para as cepas com perfil de resistência, nos ensaios com água destilada (MH+AD) e água do mar (MH+AM), aos antimicrobianos ampicilina (AMP), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET). Segundo as recomendações do CLSI (2010), foi utilizada a técnica de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton (MH), em dois ensaios, sendo o primeiro, MH acrescido de 1% de NaCl (p/v) e solubilizado em água destilada (ensaio CIM+AD) e, o segundo, MH solubilizado em água do mar com salinidade 20 (ensaio CIM+AM).

3.5.1. Preparo das soluções estoque dos antimicrobianos

As soluções-estoque foram preparadas em concentrações 10 vezes superiores a maior concentração analisada, utilizando-se diluentes e solventes diferentes para cada antimicrobiano e estabelecendo-se a concentração de 1.000 µg / mL (CLSI, 2010).

3.5.1.1. Ampicilina

Foram suspensos 0,05 g de ampicilina tri-hidratada (Sigma A6140) e solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 8,0). Posteriormente foi diluído em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0). A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de 0,22 μm de poro (Millipore).

3.5.1.2. Oxitetraciclina

Foram suspensos 0,06 g de oxitetraciclina, considerando-se uma pureza de 82,5%, e solubilizados em álcool metílico (Vetec). Após, foi diluído em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de 0,22 μm de poro (Millipore).

3.5.1.3. Tetraciclina

Foram suspensos 0,05 g de tetraciclina (Sigma T3258) solubilizados e diluídos em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo em membrana de 0,22 μm de poro (Millipore).

3.5.2. Preparo dos tubos com antimicrobianos

O tubos foram preparados com concentrações de antimicrobiano que variaram de 0 (controle) a 1.024 μg , sem que o volume de antimicrobiano ultrapassasse 40% do volume final no tubo (5 mL). A adição das alíquotas dos antimicrobianos, a partir dos estoques, foi

realizada após esterilização dos tubos dos ensaios CIM+AD ou CIM+AM em autoclave a 121°C por 15 min. (CLSI, 2010).

3.5.3. Preparo do inóculo

O inóculo padrão inicial foi obtido com base no procedimento descrito no item 3.3.1.1, com turbidez semelhante à solução 0,5 na escala de MacFarland. Para se obter a concentração final de bactérias do teste CIM, aproximadamente 5×10^5 UFC / mL, o inóculo inicial foi diluído na proporção de 1:10, correspondendo a uma concentração bacteriana de 1×10^7 UFC / mL. Desta diluição foi retirada uma alíquota de 50 μ L e inoculada nos tubos, em duplicata, com diferentes concentrações dos antimicrobianos, nos ensaios CIM+AD e CIM+AM, bem como no tubo controle e incubados a 35°C por 24 h (CLSI, 2010).

3.5.4. Interpretação dos resultados

Após o período de incubação, foi verificado se houve turvação ou não, nos tubos inoculados, a partir do tubo controle até aquele com maior concentração do antimicrobiano. Foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM), da cepa analisada, a menor concentração de antimicrobiano, na qual não foi verificada turvação do meio. Porém, para o ensaio CIM+AM, foi necessária a confirmação do crescimento através do plaqueamento, pela técnica de *pour plate*, de 1 mL do caldo em ágar padrão para contagem (PCA) contendo 1% de NaCl (p/v). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h e a positividade foi considerada quando houve crescimento de colônias, determinando-se, dessa forma, a concentração bactericida mínima.

3.6. Cálculo do índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR)

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (do inglês *multiple antibiotic resistance*) por isolado (MAR) foi calculado para as cepas de *Vibrio* spp. que apresentaram resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos, pela fórmula a/b , onde a é o número de classes de antimicrobianos que a cepa se mostrou resistente e b o número total de classes de antimicrobianos. Caso esse índice fosse superior a 0,20 a cepa era considerada multirresistente (KRUMPERMAN, 1983). O índice foi proposto nos dois ensaios: MH+AD (MAR_D) e MH+AM (MAR_M).

3.7. Fatores preliminares de virulência

Foi analisada a presença ou ausência dos fatores preliminares de virulência amilase, β -hemólise, caseinase, DNase, elastase, fosfolipase, gelatinase, lipase e urease com base nas metodologias propostas por Furniss, Lee e Donovan (1979), Rodrigues *et al.* (1993) e Rust; Messing; Iglewski (1994).

3.7.1. Amilase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente (Difco) com 1% de NaCl (p/v), suplementado com 0,1% (p/v) de amido solúvel, e incubadas a 35°C por 48 h. Para verificação da zona de ação da enzima amilase, foi adicionado lugol 1% (p/v) nas placas após o período de incubação. O lugol forma um complexo com o amido presente no meio, tornando-o roxo e revelando a ação da enzima amilase pela presença de um halo transparente ao redor do inóculo.

3.7.2. β -hemólise

As cepas puras foram renovadas em tubos com ágar TSA 1% e incubadas a 35°C por 24 h. Em cada placa de Agar Wagatsuma (Anexo) foram inoculadas até quatro cepas com auxílio da uma alça de níquel-cromo, de forma que os pontos de inoculação fossem

equidistantes. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h. O surgimento de um halo transparente ao redor do inóculo (β -hemólise) caracterizou a positividade do teste.

3.7.3. Caseinase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente 1% NaCl (p/v), suplementado com 5% (p/v) de leite em pó desnatado (Molico) e incubadas a 35°C por 24 h. A presença de um halo transparente ao redor do inóculo indicou a positividade do teste.

3.7.4. DNase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar DNase (Difco) com 1% de NaCl (p/v) (p/v), suplementado com 0,01% (p/v) de azul de toluidina e incubadas a 35°C por 48 h. A zona de ação da enzima DNase foi caracterizada pela presença de uma região rósea ao redor do inóculo.

3.7.5. Elastase

As cepas puras foram renovadas em tubos com ágar TSA 1% e incubadas a 35°C por 24 h. Em cada placa foram inoculadas quatro (4) cepas com auxílio de uma alça de níquel-cromo, de forma que os pontos de inoculação fossem equidistantes. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. O surgimento de um halo transparente ao redor do inóculo (hidrólise da elastina) caracterizou a positividade do teste.

3.7.6. Fosfolipase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar TSA 1% de NaCl (p/v) acrescido com 1% de emulsão de gema de ovo (v/v) e incubadas a 35°C por 24 h. O aparecimento de um halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano indicou a positividade no teste.

3.7.7. Gelatinase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar TSA 1% de NaCl (p/v) acrescido com 0,1% de gelatina (v/v) e incubadas a 35°C por 24 h. Para verificação da zona de ação da enzima gelatinase, foi adicionada uma solução saturada de sulfato de amônia nas placas após o período de incubação, revelando um halo transparente.

3.7.8. Lipase

As cepas foram inoculadas em placas contendo ágar TSA 1% de NaCl (p/v) acrescido com 1% de Tween 80 (Vetec) (v/v) e incubadas a 35°C por 24 h. O aparecimento de um halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano indicou a positividade no teste.

3.7.9. Urease

As cepas foram inoculadas em tubos contendo caldo uréia (Difco) e incubadas a 35°C / 24 h. O resultado positivo da presença da enzima urease, pela redução da ureia em produtos de natureza alcalina (como amônia), foi caracterizado pela mudança da cor marrom original do caldo para rósea.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de cepas de *Vibrio* spp. com perfil antimicrobiano sensível, intermediário e resistente, nos ensaios com ágar Mueller-Hinton solubilizado em água destilada (MH+AD) e em água do mar 20 ppt (MH+AM), está detalhado na tabela 1.

Tabela 1 – Número de cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú e o perfil de sensibilidade a antimicrobiano em ágar Mueller-Hinton solubilizado em água destilada e em água do mar 20 ppt.

Antimicrobiano		Ágar MH em água destilada			Ágar MH em água do mar 20 ppt		
		S	I	R	S	I	R
Ampicilina	AMP	34	10	26	30	11	29
Aztreonam	ATM	65	2	3	54	11	5
Cefalotina	CFL	39	5	26	35	1	34
Ciprofloxacina	CIP	70	0	0	58	11	1
Cloranfenicol	CLO	68	1	1	69	1	0
Ceftriaxona	CRO	67	3	0	68	2	0
Cefotaxima	CTX	67	3	0	69	1	0
Estreptomicina	EST	70	0	0	15	34	21
Gentamicina	GEN	70	0	0	37	13	20
Ácido Nalidíxico	NAL	70	0	0	36	29	5
Oxitetraciclina	OTC	59	3	8	2	0	68
Penicilina G	PEN	23	*	47	13	*	57
Sulfazotrim	SUT	70	0	0	67	0	3
Tetraciclina	TET	58	6	6	3	0	67

S = sensível, I = intermediário, R = resistente.

* não há caracterização intermediária para penicilina G.

No ensaio MH+AD, todas as cepas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos CIP, EST, GEN, NAL e SUT. Em contrapartida, foi constatada resistência para 26 (37,1%) cepas a AMP, 3 (4,3%) a ATM, 26 (37,1%) a CFL, 1 (1,4%) a CLO, 8 (11,4%) a OTC, 47 (67,1%) a PEN e 6 (8,6%) a TET (FIGURA 2).

Jones, Dennison e Preston (2001) acreditam que grandes perdas na carcinicultura, a partir de surtos de bacterioses ocorridos na Ásia e América Latina, tenham sido ocasionadas pela própria microbiota natural dos efluentes modificada pelo impacto da atividade, principalmente pelo uso de antimicrobianos. Uno *et al.* (2006) verificaram resíduos de oxitetraciclina em camarões cultivados, comprovando, assim, o uso contínuo e inapropriado deste antimicrobiano no combate de doenças e, erroneamente, usado como aditivo nutricional. Além disso, Kemper (2008) afirmam que os antimicrobianos não são plenamente

metabolizados pelo organismo animal, dessa forma, são secretados pela urina e fezes, na forma do composto original ou parcialmente metabolizado. Uma vez no ambiente, os resíduos de antimicrobianos podem se acumular no solo, sofrer lixiviação ou, ainda, serem transportados, via escoamento superficial, para os corpos hídricos (DÍAZ-CRUZ; ALDA; BARCELÓ, 2003).

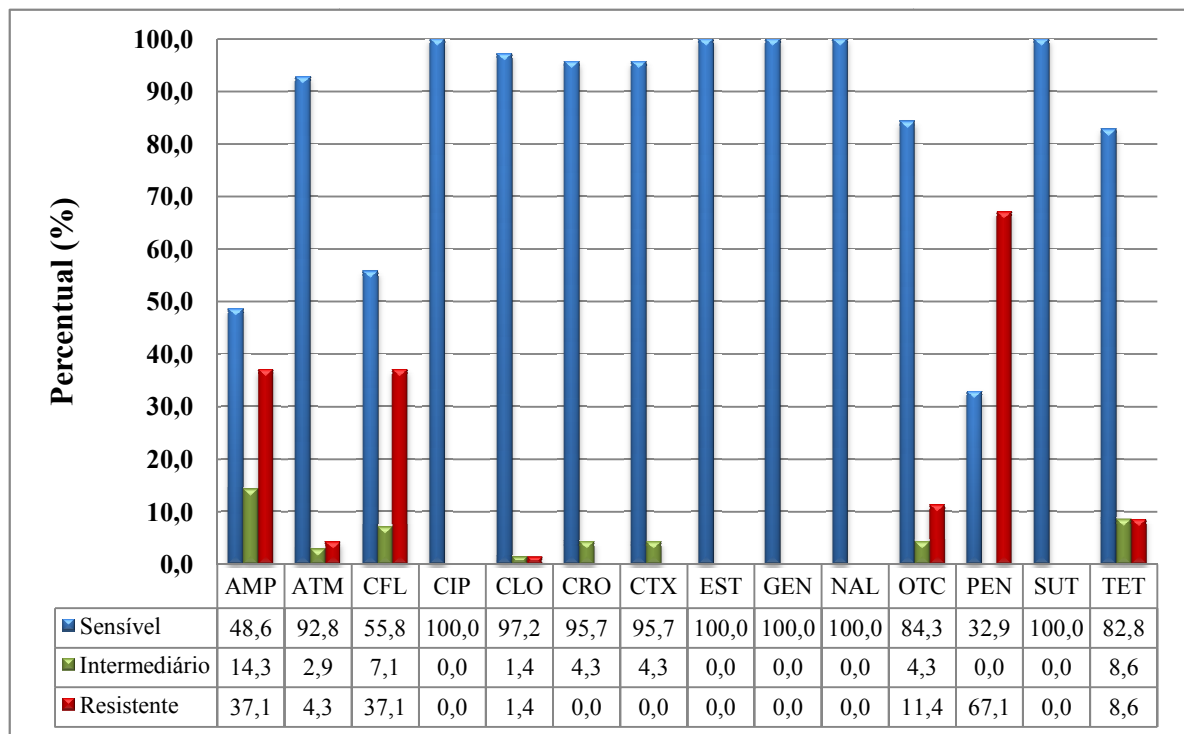


Figura 2 – Percentual de cepas de *Vibrio* spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos testados no ensaio MH+AD.

AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CFL: cefalotina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxima, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, OTC: oxitetraciclina, PEN: penicilina G, SUT: sulfazotrim e TET: tetraciclina.

O impacto de efluentes da carcinicultura sobre *Vibrio* spp. de estuários do estado do Ceará foi investigado por Menezes (2005). O autor concluiu que a atividade não exerce impacto sobre a diversidade do gênero, embora seja aceitável que bactérias confinadas em ambientes de cultivo possam ser submetidas à seleção de cepas resistentes pelo uso de antimicrobianos (PFEFFER; HITE; OLIVER, 2003).

A presença de cepas resistentes a diferentes classes de antimicrobianos (multirresistentes) nos ambientes de cultivo é uma preocupação, uma vez que, certamente, elas serão carregadas para os corpos hídricos, favorecendo a disseminação de elementos de resistência, tais como plasmídios (KUMMERER, 2003). Costa *et al.* (2008) encontraram

elevada resistência a ampicilina (25%) nas cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Já Lima *et al.* (2005), em pesquisa de *Vibrio* spp. na água de cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*), relataram resistência a todos os antimicrobianos analisados. Os mesmos autores ressaltam que essa resistência pode não estar apenas relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos na atividade aquícola, mas também pode ser uma característica fenotípica natural da própria cepa.

Rebouças *et al.* (2011), em análise da água de viveiros de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, encontraram alto percentual de cepas de *Vibrio* spp. resistentes à ampicilina e à tetraciclina. Resistência à ampicilina também foi relatada por Ferrini *et al.* (2008) em *Vibrio* spp. isolados de alimentos de origem marinha. Esses autores associam a alta taxa de resistência encontrada à presença de cepas resistentes no ambiente de origem. Vaseeharan *et al.* (2005) consideram essa resistência à ampicilina comum entre os isolados de *Vibrio* spp., principalmente, em decorrência do histórico de extensivo uso clínico do antimicrobiano.

No Brasil, o uso de oxitetraciclina é bastante comum em pisciculturas comerciais como medida profilática e para o controle de surtos de doenças bacterianas (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2006). Além disso, segundo Wang *et al.* (2008), também é amplamente utilizado na prática veterinária, erroneamente, como aditivo na alimentação, para promover o crescimento, devido seu amplo espectro de ação contra bactérias e seu baixo custo. Seu uso contínuo pode causar aumento da frequência de isolados bacterianos resistentes e aumentar, quantitativamente, a resistência, dificultando tratamentos futuros e elevando o risco para a cadeia alimentar humana (REED; SIEWICKI; SHAH, 2004). Apesar da ampla utilização, não há regulamentação para o uso deste antimicrobiano.

Quanto às espécies de *Vibrio* analisadas, todas apresentaram, pelo menos, uma cepa resistente aos antimicrobianos testados. As maiores recorrências foram de *V. mimicus*, e *V. coralliilyticus*. Este fato pode ser justificado por essas duas espécies terem os maiores números de cepas em análise, embora, tenha acontecido também resistência em espécies que apresentaram apenas um representante (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de cepas de *Vibrio* spp., por espécie, isolados da água e do sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência aos antimicrobianos analisados no ensaio MH+AD.

Espécies	N	S	Número de cepas com perfil de resistência por antimicrobiano testado*														
			AMP	ATM	CFL	CIP	CLO	CRO	CTX	EST	GEN	NAL	OTC	PEN	SUT	TET	
<i>V. calviensis</i>	1	0	1		1										1		
<i>V. cholerae</i>	3	1												2	2		
<i>V. coralliilyticus</i>	18	2	10		9									1	16		1
<i>V. diabolicus</i>	3	0	1												3		
<i>V. fortis</i>	1	0													1		
<i>V. gigantis</i>	1	0												1			1
<i>V. harveyi</i>	1	0	1												1		
<i>V. litoralis</i>	1	0													1		
<i>V. logei</i>	1	0	1												1		1
<i>V. mimicus</i>	32	9	9	3	11									1	16		1
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	0	1		2										2		
<i>V. proteolyticus</i>	2	0	1		2									2	2		2
<i>V. ruber</i>	1	0			1												
<i>V. rumoiensis</i>	1	0	1											1	1		
Total	70	12	26	3	26	0	0	0	0	0	0	0	0	8	47	0	6

*em casos de multirresistência, a mesma cepa foi contabilizada para o(s) outro(s) antimicrobiano(s).

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

S: número total de cepas com perfil sensível por espécie de *Vibrio*.

AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CFL: cefalotina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxima, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidixico, OTC: oxitetraciclina, PEN: penicilina G, SUT: sulfazotrim e TET: tetraciclina.

A única cepa de *V. calviensis* (V01) apresentou resistência a AMP, CFL e PEN, enquanto duas de *V. cholerae* (V03 e V04) a OTC e PEN. A recorrência de cepas de *Vibrio* spp. resistentes à penicilina G também foi relatada por Colares (2010) em estudo de cepas provenientes da hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei*. Tortora, Funke e Case (2005) explicam que esse antimicrobiano age sobre a síntese da parede celular bacteriana pelo impedimento das ligações transversais entre os peptidoglicanos. Porém, apresenta espectro de ação limitado, sendo, basicamente, indicado para o tratamento de bactérias Gram positivas, como as do gênero *Staphylococcus* (KUMMERER, 2003). Além disso, Garau (1994) ressalta que algumas cepas de *V. cholerae* são capazes de produzir enzimas β -lactamases de espectro expandido (ESBL) e, dessa forma, clivam o anel β -lactâmico presente nos antimicrobianos do grupo das penicilinas, inativando-os

Resistência a CFL foi verificada em cepas das espécies *V. calviensis* (1), *V. coralliilyticus* (9), *V. mimicus* (11), *V. parahaemolyticus* (2), *V. proteolyticus* (2) e *V. ruber* (1). Esses resultados demonstram a ineficiência desse antimicrobiano frente às cepas de *Vibrio* spp. no presente estudo, embora ampla sensibilidade a víbrios já tenha sido demonstrada por Saavedra *et al.* (2004) e Okumura *et al.* (2009), pesquisando cepas que acometem o cultivo de robalo (*Dicentrarchus labrax*) e do ambiente marinho do Japão, respectivamente.

O perfil intermediário para as cepas analisadas foi verificado aos antimicrobianos AMP, ATM, CFL, CLO, CRO, CTX, OTC e TET. Segundo o CLSI (2010), uma cepa que apresenta esse perfil é caracterizada como clinicamente tratável, pois uma concentração do antimicrobiano superior à clinicamente usada pode ser eficaz no tratamento de infecções decorrentes da mesma. Porém, alguns autores correlacionam esse perfil como resultante de uma pressão seletiva de baixas concentrações dos antimicrobianos, frente às bactérias, sendo um indício de que um maior percentual dessa população bacteriana tende à resistência, dado o uso de concentrações cada vez maiores para combatê-las (AKOND *et al.*, 2009; HANNAH *et al.*, 2005).

Dentre os antimicrobianos testados, CIP, EST, GEN, NAL e SUT apresentaram 100% de eficiência contra as cepas analisadas. Mesmo esse resultado sendo satisfatório, no ensaio MH+AD, houve recorrência de cepas multirresistentes (Tabela 3). Essas cepas caracterizadas como multirresistentes foram das espécies *V. calviensis*, *V. cholerae*, *V. coralliilyticus*, *V. logei*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus* e *V. rumoiensis*. Não foram relatadas cepas com resistência a mais de duas classes de antimicrobianos nas espécies de *Vibrio* analisadas. O índice de multirresistência aos antimicrobianos (MAR_D), no

ensaio MH+AD, foi calculado para cepas que apresentaram resistência a mais de uma classe de antimicrobianos testados.

Tabela 3 – Número de cepas de *Vibrio* spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência e índice de multirresistência por espécie analisada no ensaio MH+AD (MAR_D).

Espécies	N	S	Número de cepas resistentes a <i>n</i> classes de antimicrobianos			MAR _D
			<i>n</i>			
			1	2	>2	
<i>V. calviensis</i>	1	0		1		0,22 (1*)
<i>V. cholerae</i>	3	1		2		0,22 (2)
<i>V. coralliilyticus</i>	18	2	6	10		0,22 (10)
<i>V. diabolicus</i>	3	0	3			**
<i>V. fortis</i>	1	0	1			**
<i>V. gigantis</i>	1	0	1			**
<i>V. harveyi</i>	1	0	1			**
<i>V. litoralis</i>	1	0	1			**
<i>V. logei</i>	1	0		1		0,22 (1)
<i>V. mimicus</i>	32	9	11	12		0,22 (11)
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	0		2		0,22 (2)
<i>V. proteolyticus</i>	4	0	1	3		0,22 (3)
<i>V. ruber</i>	1	0	1			**
<i>V. rumoiensis</i>	1	0		1		0,22 (1)
Total	70	12				

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

S: número total de cepas com perfil sensível por espécie de *Vibrio*.

MAR_D: índice de multirresistência a antimicrobianos das cepas de *Vibrio* spp. no ensaio MH+AD.

* quantidade de cepas da espécie de *Vibrio* para as quais o índice MAR_D foi calculado.

** não apresentou cepas resistentes a mais de uma classe de antimicrobianos.

No geral, o índice MAR_D, quando calculado, foi de 0,22. As cepas, para as quais o índice não foi calculado foram das espécies *V. diabolicus*, *V. fortis*, *V. gigantis*, *V. litoralis*, *V. harveyi* e *V. ruber*. Portanto, segundo o proposto por Krumperman (1983), as cepas destas espécies não foram caracterizadas como multirresistentes.

As cepas de *V. cholerae* (1), *V. coralliilyticus* (2) e *V. mimicus* (9) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Embora tenha sido detectada multirresistência, os resultados foram considerados baixos, uma vez que o máximo de classes de antimicrobianos encontrados, por cepa com múltipla resistência, foi de resistência a duas.

Das 70 cepas analisadas, no ensaio MH+AD, 58 cepas (82,9%) apresentaram resistência a, pelo menos, um antimicrobiano testado, sendo submetidas ao procedimento de cura do plasmídeo pelo agente curagênico acridine orange (Tabela 4). Das 26 (37,1%) cepas resistentes a AMP, 21 (30%) apresentaram resistência caracterizada como plasmidial, enquanto das 26 (37,1%) para CFL, 8 (11,4%) para OTC, 47 (67,1%) para PEN e 6 (8,6%)

para TET o mesmo diagnóstico de resistência foi verificado em 4 (5,7%), 1 (1,4%), 16 (22,6%) e 2 (2,8%), respectivamente.

Tabela 4 – Caracterização da resistência em cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE no ensaio MH+AD.

Antimicrobianos	Nº de cepas	Caracterização da resistência	
		Cromossômica	Plasmidial
Ampicilina (AMP)	26	5 (7,1%)	21 (30,0%)
Aztreonam (ATM)	3	0	3 (4,3%)
Cefalotina (CFL)	26	22 (31,4%)	4 (5,7%)
Cloranfenicol (CLO)	1	1 (1,4%)	0
Oxitetraciclina (OTC)	8	7 (10,0%)	1 (1,4%)
Penicilina G (PEN)	47	31(44,3%)	16 (22,6%)
Tetraciclina (TET)	6	4 (5,7%)	2 (2,8%)

A única cepa resistente a CLO (V50) teve sua resistência caracterizada como cromossômica. Em contrapartida, as três cepas resistentes a ATM (V36, V37 e V43) tiveram sua resistência caracterizada como plasmidial. Em ambos os casos, as cepas eram da espécie *V. mimicus*.

Colares (2010) relata maior recorrência de resistência de natureza cromossômica, em *Vibrio* spp. isolado de camarões peneídeos, aos antimicrobianos CFL e PEN, fato confirmado no presente estudo. Embora tenha sido verificada incidência de resistência cromossômica, o maior percentual de resistência plasmidial foi verificado ao antimicrobiano AMP (30,0%) (Tabela 4). Molina-Aja *et al.* (2002), em estudo sobre perfil plasmidial e resistência a antibióticos em cepas de *Vibrio* isoladas de peneídeos, atribuem a um plasmídio de 21.226 pares de bases (pb) a capacidade de codificar resistência à cefalotina, caracterizando, dessa forma, como plasmidial.

Na maioria dos casos, a resistência a antimicrobianos mediada por genes cromossômicos ocorre devido a uma modificação do seu sítio de ação, em contraste ao plasmídio R, que é devido a genes que codificam novas enzimas que inativam a droga ou impedem sua absorção ou efluxo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Cepas bacterianas com resistência plasmidial representam um problema de saúde pública, pois elementos genéticos de resistência podem ser facilmente disseminados por esses micro-organismos para outros da mesma espécie ou de espécies diferentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Já é sabido que outros elementos genéticos, os integrons, podem ser

disseminados e inseridos no cromossomo bacteriano, como verificado em cepas de *V. cholerae* (FLUIT; SCHIMITZ, 2004).

Para as cepas resistentes a AMP (26), OTC (8) e TET (6), no ensaio MH+AD, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM+AD), como detalhado na tabela 5.

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos ampicilina (AMP), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET) por espécie de *Vibrio* resistentes, no ensaio MH+AD, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.

Espécies	N	Ampicilina (AMP) µg/mL								
		2	4	8	16	32	64	128	256	> 256
<i>V. calviensis</i>	1					1				
<i>V. coralliilyticus</i>	10					1	1	8		
<i>V. diabolicus</i>	1						1			
<i>V. harveyi</i>	1						1			
<i>V. logei</i>	1						1			
<i>V. mimicus</i>	10					2	1	5	2	
<i>V. parahaemolyticus</i>	1						1			
<i>V. rumoiensis</i>								1		
Oxitetraciclina (OTC) µg/mL										
<i>V. cholerae</i>	2					2				
<i>V. coralliilyticus</i>	1					1				
<i>V. gigantis</i>	1						1			
<i>V. mimicus</i>	1							1		
<i>V. proteolyticus</i>	1						2			
<i>V. rumoiensis</i>	2						1			
Tetraciclina (TET) µg/mL										
<i>V. coralliilyticus</i>	1					1				
<i>V. gigantis</i>	1					1				
<i>V. logei</i>	1					1				
<i>V. mimicus</i>	1						1			
<i>V. proteolyticus</i>	2					2				

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

Em nenhuma das cepas analisadas foi verificada CIM superior a 256 µg/mL para os três antimicrobianos testados, da mesma forma que não foi verificada CIM menor que 32

$\mu\text{g/mL}$. No geral, a CIM variou de 32 a 256 $\mu\text{g/mL}$ para AMP, 32 a 128 $\mu\text{g/mL}$ para OTC e 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para TET (Tabela 5).

Os menores valores de CIM para AMP foram relatados para cepas de *V. calviensis* (1), *V. coralliilyticus* (1) e *V. mimicus* (2), enquanto que, para OTC, foram para as espécies *V. cholerae* (2) e *V. coralliilyticus* (1) e para TET, *V. coralliilyticus* (1), *V. gigantis* (1) e *V. logei* (1) e *V. proteolyticus* (2).

Avaliando o perfil de sensibilidade de cepas de *Aeromonas hydrophila*, Pereira Júnior *et al.* (2006) encontraram resistência a OTC com valores de CIM entre 100 a 800 $\mu\text{g/mL}$. Já Roque *et al.* (2001), ao analisar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Vibrio* isoladas de camarão cultivado, encontraram CIM média de 304 $\mu\text{g/mL}$. Altos valores de CIM para OTC também foram encontrados por Rebouças *et al.* (2011), ao avaliar cepas de *Vibrio* spp. da água de viveiros de peneídeos, encontrando valores entre 434 e 698 $\mu\text{g/mL}$.

Colares (2010) determinando valores de CIM para TET em cepas de *Vibrio* isoladas da hemolinfa de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, encontrou valores abaixo de 32 $\mu\text{g/mL}$, discordando dos dados do presente trabalho.

No ensaio da avaliação da influência da água do mar, no perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Vibrio* spp. isoladas, foi verificada recorrência da resistência a 11 dos 14 antimicrobianos testados. Dentre as cepas, 29 (41,4%) cepas foram resistentes a AMP, 5 (7,2%) a ATM, 34 (48,6%) a CFL, 1 (1,4%) a CIP, 21 (30,0%) a EST, 20 (28,5%) a GEN, 5 (7,1%) a NAL, 68 (97,1%) a OTC, 57 (81,4%) a PEN, 3 (4,3%) a SUT e 67 (95,7%) a TET (Tabela 1, Figura 3). As maiores alterações do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas analisadas, entre os MH+AD e MH+AM, ocorreram para EST, GEN, OTC e TET.

Quanto às espécies de *Vibrio* analisadas, no ensaio MH+AM, todas as cepas foram resistentes a, pelo menos, uma classe de antimicrobianos (Tabela 6). A única cepa de *V. calviensis* (V01), que no ensaio MH+AD apresentou resistência a AMP, CFL e PEN, neste ensaio (MH+AM) modificou completamente seu perfil, passando a expressar resistência a EST, GEN, OTC e TET. Foram constatadas resistências a cepas de todas as espécies testadas a OTC (69) e TET (68). Em comparação ao ensaio MH+AD, houve aumento no número de cepas resistentes a todos os antimicrobianos testados, com exceção de CLO, CRO e CTX. A esses antimicrobianos nenhuma cepa testada apresentou resistência.

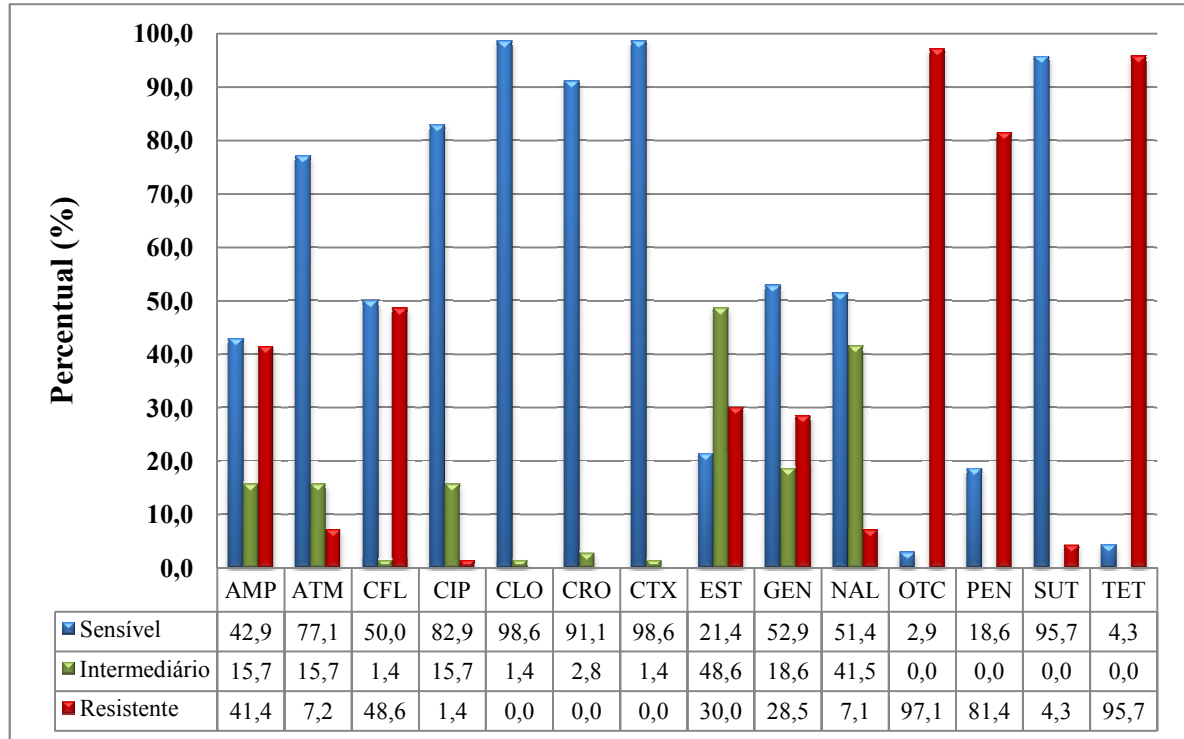


Figura 3 – Percentual de cepas de *Vibrio* spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos testados no ensaio MH+AM.

AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CFL: cefalotina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxima, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, OTC: oxitetraciclina, PEN: penicilina G, SUT: sulfazotrim e TET: tetraciclina.

Sabe-se que certos componentes da água do mar podem influenciar a susceptibilidade das bactérias aos agentes de vários modos. As alterações observadas nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) devido à adição de água do mar podem ser explicadas tanto pelos efeitos sobre a fisiologia da bactéria como pelas interações com a própria substância antimicrobiana (LUNESTAD; SAMUELSEN, 2001; TORKILDSEN *et al.*, 2000).

Segundo Kummerer e Henninger (2003), as tetraciclina agem sobre a síntese protéica bacteriana, interferindo na fixação do t-RNA e, conseqüentemente, impedindo a adição de aminoácidos à cadeia polipeptídica. De fato, essa mudança no perfil das cepas para os antimicrobianos da classe das tetraciclina era esperada, pois a água do mar interfere, significativamente, sobre a carga elétrica deste antimicrobiano devido às presenças dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992). Dessa forma, a formação do complexo entre o antimicrobiano e os cátions supracitados, além de modificar a carga elétrica, impede sua difusão passiva pela membrana bacteriana, inibindo sua ação (LAMBS *et al.*, 1988).

Tabela 6 – Número de cepas de *Vibrio* spp., por espécie, isolados da água e do sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência aos antimicrobianos analisados no ensaio MH+AM.

Espécies	N	Número de cepas com perfil de resistência por antimicrobiano testado*													
		AMP	ATM	CFL	CIP	CLO	CRO	CTX	EST	GEN	NAL	OTC	PEN	SUT	TET
<i>V. calviensis</i>	1								1	1		1			1
<i>V. cholerae</i>	3								1			3	2		3
<i>V. coralliilyticus</i>	18	15	3	11					4	3		18	18	1	17
<i>V. diabolicus</i>	3	2		1					1	1	1	3	2		3
<i>V. fortis</i>	1								1	1		1	1		1
<i>V. gigantis</i>	1											1	1		1
<i>V. harveyi</i>	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1		1
<i>V. littoralis</i>	1			1								1	1		1
<i>V. logei</i>	1			1						1		1	1		1
<i>V. mimicus</i>	32	10	1	18					11	9	2	31	25	2	30
<i>V. parahaemolyticus</i>	2											2	1		2
<i>V. proteolyticus</i>	4			1						2	1	3	3		4
<i>V. ruber</i>	1											1			1
<i>V. rumoiensis</i>	1	1							1	1		1	1		1
Total	70	29	5	34	1	0	0	0	21	20	5	69	57	3	67

*em casos de multirresistência, a mesma cepa foi contabilizada para o(s) outro(s) antimicrobiano(s).

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CFL: cefalotina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxima, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidixico, OTC: oxitetraciclina, PEN: penicilina G, SUT: sulfazotrim e TET: tetraciclina.

Lunestad e Goksoyr (1990) confirmam que a permanência de oxitetraciclina no ambiente marinho é significativamente mediada pela sua capacidade de formar complexos com o magnésio e cálcio resultando em apenas cerca de 5% encontrado em uma forma antibacteriana ativa. Sua eficiência contra espécies de *Vibrio*, entre os quais se encontram os principais patógenos dos organismos cultivados, (LIGHTNER, 1993), e também sua ação no tratamento da necrose hepatopancreática são os principais incentivos para a escolha dessa droga entre os produtores.

De acordo com Smith (1998), o efeito da água do mar sobre a atividade antibacteriana pode estar além da inibição de antimicrobianos por cátions divalentes, podendo ocorrer interação de alguns de seus componentes com a composição do meio de cultivo, concorrendo para alterar a taxa de crescimento bacteriano, bem como a eficiência do antibiótico. Segundo o autor, a interação entre fosfato (PO_4^{-3}) e magnésio (Mg^{2+}) pode resultar, durante a autoclavação do meio de cultura, em um grau variável de precipitação, provavelmente, como fosfato de magnésio $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ insolúvel. A formação desse precipitado somado à influência dos cátions divalentes altera sobremaneira a ação do agente antibacteriano.

A modificação diferenciada da susceptibilidade a antimicrobianos para cada espécie de *Vibrio* pode estar relacionada ao efeito da água do mar sobre a célula bacteriana. Nesse contexto, Abdallah, Kallel e Bakhrouf (2009), em avaliação sobre respostas adaptativas de víbrios mantidos em água do mar, relataram alterações na expressão de proteínas da membrana e sugeriram que elas concorrem para modificações no perfil de resistência a alguns antibióticos. De acordo com Carlucci e Pramer (1959), os sais inorgânicos contidos na água do mar podem influenciar na sobrevivência bacteriana pela alteração do seu estado osmótico ou pela toxicidade dos seus íons.

Todas as cepas de *Vibrio* spp., no ensaio MH+AM, apresentaram resistência a, pelo menos, uma classe de antimicrobiano. A única cepa de *V. harveyi* (V28) apresentou resistência aos antimicrobianos de sete classes diferentes (aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluorquinolonas, monobactâmicos, penicilinas, quinolonas e tetraciclina), obtendo, portanto, o maior índice MAR_M registrado de 0,78 (Tabela 7).

Esses resultados demonstram a significativa mudança no perfil das cepas de *Vibrio* spp., pela influência da água do mar, na expressão de resistência. O índice MAR_M não foi calculado para *V. ruber*, pois a única cepa representante (V69) foi resistente apenas à classe das tetraciclina, à semelhança dos outros isolados.

Para as cepas resistentes a AMP (29), OTC (68) e TET (67), no ensaio MH+AM, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM+AM), como detalhado na tabela 8.

Tabela 7 – Número de cepas de *Vibrio* spp. isolados da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE com perfil de resistência e índice de multirresistência por espécie analisada no ensaio MH+AM (MAR_M).

Espécies	N	Número de cepas resistentes a <i>n</i> classes de antimicrobianos								MAR _M
		<i>n</i>								
		1	2	3	4	5	6	7	>7	
<i>V. calviensis</i>	1		1							0,22 (1*)
<i>V. cholerae</i>	3	1	1	1						0,22 a 0,33 (2)
<i>V. coralliilyticus</i>	18		2	12	4					0,22 a 0,44 (18)
<i>V. diabolicus</i>	3		1	2						0,22 a 0,33 (3)
<i>V. fortis</i>	1			1						0,33 (1)
<i>V. gigantis</i>	1		1							0,22 (1)
<i>V. harveyi</i>	1							1		0,78 (1)
<i>V. littoralis</i>	1			1						0,33 (1)
<i>V. logei</i>	1				1					0,44 (1)
<i>V. mimicus</i>	32	3	11	6	11	1				0,22 a 0,56 (29)
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	1	1							0,22 (1)
<i>V. proteolyticus</i>	4		2	1	1					0,22 a 0,44 (4)
<i>V. ruber</i>	1	1								**
<i>V. rumoiensis</i>	1			1						0,33 (1)
Total	70									

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

MAR_M: índice de multirresistência a antimicrobianos das cepas de *Vibrio* spp. no ensaio MH+AM.

* quantidade de cepas da espécie de *Vibrio* para as quais o índice MAR_D foi calculado.

** não apresentou cepas resistentes a mais de uma classe de antimicrobianos.

No ensaio CIM+AM, para AMP, os valores variaram de 32 µg/mL a 256 µg/mL, no entanto, para OTC e TET esses chegaram a valores superiores a 256 µg/mL. Esses resultados são bem superiores aos encontrados no ensaio CIM+AD, no qual os valores máximos para TET e OTC foram 64 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente, confirmando a influência da água do mar.

A única cepa de *V. harveyi* teve uma CIM superior nesse ensaio (CIM+AM) em comparação ao ensaio anterior (CIM+AD) para AMP. Rebouças *et al.* (2011) encontraram CIM para cepas de *Vibrio* spp. da água de viveiros de peneídeos, para OTC, com valores entre 434 a 692 µg/mL. O relato de cepas com altos valores de CIM, no ensaio CIM+AM, para os três antimicrobianos mais comumente associados ao extensivo uso clínico e veterinário, é um importante dado para avaliação da microbiota presente no ambiente, no que concerne ao impacto antrópico.

Tabela 8 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos ampicilina (AMP), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TET) por espécie de *Vibrio* resistentes, no ensaio MH+AM, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.

Espécies	N	Ampicilina (AMP) µg/mL								
		2	4	8	16	32	64	128	256	> 256
<i>V. coralliilyticus</i>	15					1	7	5	2	
<i>V. diabolicus</i>	2					1	1			
<i>V. harveyi</i>	1							1		
<i>V. mimicus</i>	10						3	4	3	
<i>V. rumoiensis</i>	1								1	
		Oxitetraciclina (OTC) µg/mL								
<i>V. calviensis</i>	1							1		
<i>V. cholerae</i>	3							1	1	1
<i>V. coralliilyticus</i>	18					2	1	5	3	7
<i>V. diabolicus</i>	3					1		2		
<i>V. fortis</i>	1							1		
<i>V. gigantis</i>	1									1
<i>V. harveyi</i>	1							1		
<i>V. littoralis</i>	1							1		
<i>V. logei</i>	1								1	
<i>V. mimicus</i>	32					11	3	5	8	5
<i>V. parahaemolyticus</i>	2							1		
<i>V. proteolyticus</i>	3								1	2
<i>V. ruber</i>	1							1		
<i>V. rumoiensis</i>	1							1		
		Tetraciclina (TET) µg/mL								
<i>V. calviensis</i>	1								1	
<i>V. cholerae</i>	3							1	2	
<i>V. coralliilyticus</i>	18					1	3	4	7	3
<i>V. diabolicus</i>	2							1	2	
<i>V. fortis</i>	1							1		
<i>V. gigantis</i>	1							1		
<i>V. harveyi</i>	1							1		
<i>V. littoralis</i>	1								1	
<i>V. logei</i>	1							1		
<i>V. mimicus</i>	30					5		4	8	13
<i>V. parahaemolyticus</i>	2								2	
<i>V. proteolyticus</i>	3									4
<i>V. ruber</i>	1							1		
<i>V. rumoiensis</i>	1							1		

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

As cepas de *Vibrio* spp. foram avaliadas quanto à presença de fatores preliminares de virulência, a fim de se relacioná-los ao perfil de susceptibilidade antimicrobiano já comentado. Os fatores preliminares, basicamente, foram enzimas relacionadas à virulência de cepas bacterianas, nas quais estão proteases (caseinase, elastase e gelatinase), lipases, fosfolipases, DNases, amilases, urease e hemolisinas (β -hemólise pelo teste de Kanagawa em ágar Wagatsuma).

Por ordem de recorrência, 67 (91,42%) cepas de *Vibrio* spp. analisadas apresentam atividade da enzima urease, seguidas de 57 (81,42%) para lipase, 54 (77,14%) a amilase, 53 (75,72%) a gelatinase, 43 (61,42%) a caseinase, 26 (37,14%) a fosfolipase, 17 (24,28%) a DNase, 16 (22,86%) a elastase e 13 (18,57%) a β -hemólise (Kanagawa). Nas figuras 4 a 12 estão apresentados os resultados positivos para os testes enzimáticos.

Experimentos para investigação da patogenicidade de *Vibrio* em camarão têm utilizado diferentes métodos de infecção: imersão, injeção intramuscular e intubação oral (KARUNASAGAR *et al.*, 1994). Esses estudos demonstram claramente que a patogenicidade varia muito, sendo um processo complexo, afetado por muitas variáveis, incluindo o patógeno, espécies de *Vibrio*, etapa do desenvolvimento, condição fisiológica, estresse ambiental, dose, tempo e métodos de infecção, ressaltando a importância de testes *in vivo* para o diagnóstico de patogenicidade (HARRIS; OWENS, 1999).

Rodrigues *et al.* (1993) analisando fatores de virulência em cepas de *V. vulnificus* ambientais, encontraram 100 % de recorrência para os fatores de virulência DNase, amilase, fosfolipase e gelatinase, que foram observados na presente pesquisa em percentuais variáveis, porém inferiores ao do referido trabalho.



Figura 4 – Halo transparente no teste da amilase.
Foto: Rafael dos Santos Rocha.

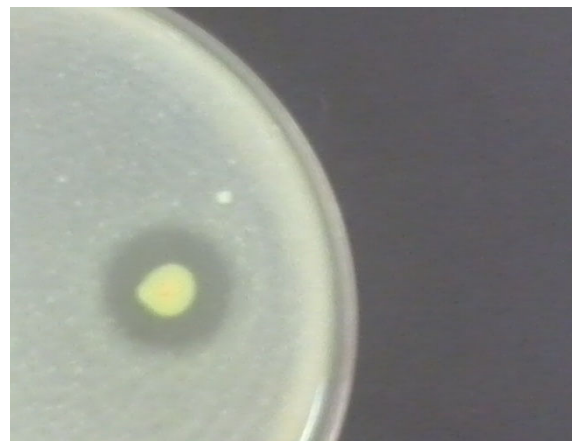


Figura 4 – Halo transparente no teste da caseinase.
Foto: Ludimila Maria Mendonça Conde Amorim.

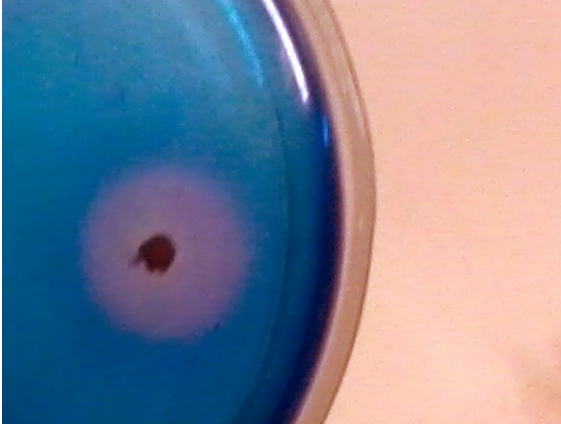


Figura 6 – Coloração rósea ao redor do inoculo no teste da DNase. Foto: Ludimila Maria Mendonça Conde Amorim.



Figura 7 – Halo transparente no teste da elastase. Foto: Rafael dos Santos Rocha.

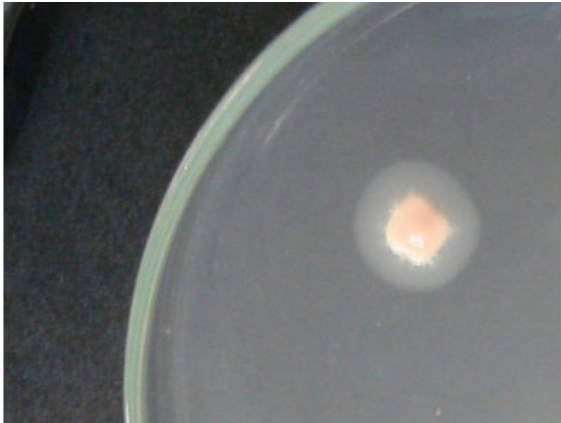


Figura 8 – Halo opalescente no teste da fosfolipase. Foto: Rafael dos Santos Rocha.

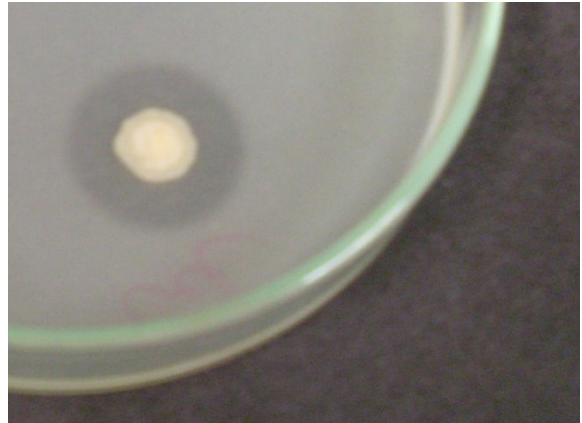


Figura 9 – Halo transparente no teste da gelatinase. Foto: Ludimila Maria Mendonça Conde Amorim.

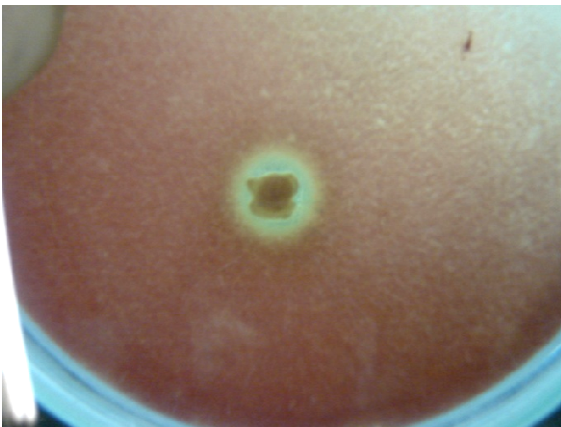


Figura 10 - Halo transparente no teste de β – hemólise de Kanagawa em ágar Wagatsuma. Foto: Rafael dos Santos Rocha



Figura 11 - Halo opalescente no teste da lipase. Foto: Rafael dos Santos Rocha

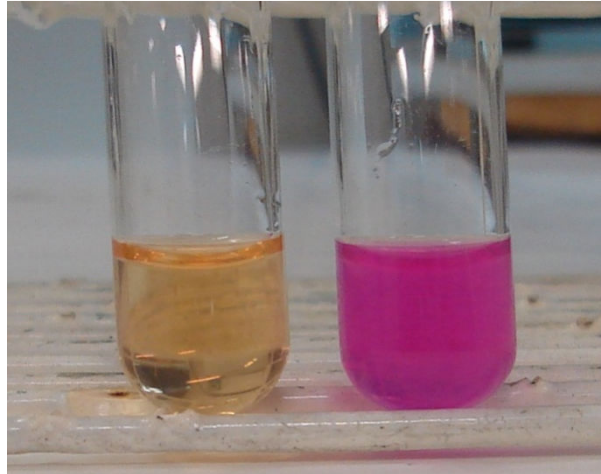


Figura 12 – Tubo positivo (à direita) para produção da enzima urease, com coloração rósea característica. Foto: Rafael dos Santos Rocha

Lafisca *et al.* (2008), analisando *V. alginolyticus* isolados de bivalves da costa brasileira e italiana, encontraram alta incidência de cepas com produção da enzima elastase. Segundo Alp e Arikan (2008) a enzima elastase atua clivando a elastina, que juntamente com o colágeno, determina as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo, sendo um importante fator de virulência.

Das duas cepas de *V. parahaemolyticus* analisadas, ambas apresentaram ação da enzima urease, entretanto β -hemólise foi verificada apenas para cepa V63. As cepas isoladas a partir de ambiente marinho, em sua maioria, não são patogênicas enquanto, aquelas provenientes de isolados clínicos são Kanagawa positivas, ou seja, induzem a reação de β -hemólise nos eritrócitos humanos (DEPAOLA *et al.*, 2003; ELLISON *et al.*, 2001). Embora essa combinação de potenciais fatores de virulência seja reconhecida entre hemolisina (β -hemólise) e urease para *V. parahaemolyticus*, neste experimento, também foi relatada para três cepas de *V. coralliilyticus*, uma de *V. diabolicus*, cinco de *V. mimicus* e uma de *V. proteolyticus*. A alta incidência de cepas urease positivas diferiu muito do relatado na literatura, uma vez que se tratavam de cepas ambientais.

Dentre as espécies testadas, as cepas de *V. mimicus* apresentaram produção de 100% dos fatores preliminares de virulência analisados, seguido de *V. coralliilyticus* e *V. diabolicus* (Tabela 9).

Tabela 9 – Perfil dos fatores preliminares de virulência das cepas de *Vibrio* spp., por espécie, isoladas da água e sedimento do estuário do rio Acaraú/CE.

Espécies	N	n	Fatores preliminares de virulência analisados*								
			Amilase	Caseinase	DNase	Elastase	Fosfolipase	Gelatinase	Kanagawa	Lipase	Urease
<i>V. calviensis</i>	1	0	1						1		1
<i>V. cholerae</i>	3	0	3	1				1	3		3
<i>V. coralliilyticus</i>	18	0	16	13	4			14	14	5	11
<i>V. diabolicus</i>	3	0	3	2	1			1	2	1	3
<i>V. fortis</i>	1	0	1	1				1	1		1
<i>V. gigantis</i>	1	0							1		1
<i>V. harveyi</i>	1	0	1						1		1
<i>V. litoralis</i>	1	0	1					1	1		1
<i>V. logei</i>	1	0	1					1	1		1
<i>V. mimicus</i>	32	0	22	22	9	16		6	21	5	27
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	0	1	1					1	1	1
<i>V. proteolyticus</i>	4	0	2	2	2			1	3	1	3
<i>V. ruber</i>	1	0	1						1		1
<i>V. rumoiensis</i>	1	0	1	1					1		1
Total	70	0	54	43	17	16		26	53	13	57

N: número total de cepas por espécie de *Vibrio* analisada.

n: número total de cepas que não apresentaram fatores preliminares de virulência por espécie de *Vibrio*.

Produção de lipase, urease e gelatinase foi verificada em, pelo menos, uma cepa das espécies de *Vibrio* analisadas. Furniss, Lee e Donovan (1978) relatam que lipase é uma enzima recorrente em espécies de *Vibrio* spp. patogênicas. Os mesmos autores explicam que a patogenicidade de cepas lipase positivas é devido a essa enzima clivar ligações entre ácidos graxos protetores da pele em humanos.

A gelatinase é uma protease classificada como metaloendopeptidase extracelular, codificada pelo gene *gelE*. É rica em resíduos de histidina, os quais servem de sítios de ligação para o íon zinco. Extremamente hidrofóbica, seu pH ótimo de atuação varia entre 6,0 e 8,0. É uma enzima capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004; VERGIS *et al.*, 2002). A presença de cepas gelatinase positivas em todas as espécies analisadas é um resultado preocupante, pois são cepas ambientais.

Fosfolipase foi relatada em oito espécies: *V. cholerae*, *V. coralliilyticus*, *V. diabolicus*, *V. fortis*, *V. litoralis*, *V. logei*, *V. mimicus* e *V. proteolyticus*. Segundo Moreno e Landgraf (1998), a lecitinase, uma importante fosfolipase, é conhecida como uma α -toxina em *Clostridium perfringens*, com forte efeito citotóxico em várias células, especialmente para hemácias. Os mesmos autores associam a presença dessa enzima com a produção de outra, a DNase, um importante indício de patogenicidade, uma vez que essa última enzima é capaz de hidrolisar o ácido desoxirribonucléico. Embora estudos de fatores de virulência enzimáticos forneçam resultados satisfatórios, a confirmação do potencial patogênico de uma cepa só é comprovada com testes *in vivo* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

De fato, para uma cepa ser considerada patogênica não a qualifica como clinicamente não tratável. Normalmente, o tratamento de bactérias que acometem os seres humanos ocorre pelo uso de antimicrobianos (TAVARES, 2001).

As cepas mais recorrentes com fatores de virulência relacionados e resistência foram das espécies *V. mimicus* (V61 e V37) e *V. coralliilyticus* (V06, V09 e V13). A patogenicidade de *V. coralliilyticus* ainda não é bem esclarecida, sendo os resultados encontrados no presente estudo um importante dado para investigação dessa espécie.

O advento de técnicas moleculares permite investigar a presença de genes que codificam fatores de virulência, podendo-se, assim, classificar as estirpes isoladas em potencialmente patogênicas ou não (DALSGAARD *et al.*, 1998). No entanto, a utilização simultânea de dados fenotípicos e genotípicos é indispensável para a caracterização da patogenicidade de um isolado (HUSS, 1994). Os efeitos da resistência antimicrobiana para o ecossistema aquático estrutura e função permanecem desconhecidas, mas a implicação da

resistência generalizada para a saúde humana é preocupante (CRANE; WATTS; BOUCARD, 2006).

5. CONCLUSÕES

- ✓ No ensaio convencional, MH+AD, as cepas de *Vibrio* spp. apresentaram baixo perfil de múltipla resistência a antimicrobianos entre as diferentes espécies, embora tenha sido verificado alto percentual de resistência caracterizada como plasmidial;
- ✓ A água do mar influenciou, significativamente, a caracterização da resistência das cepas de *Vibrio* spp. analisadas, principalmente, sobre os antimicrobianos das classes das tetraciclinas;
- ✓ As cepas de *Vibrio* spp. apresentaram perfil preliminar de virulência bastante estendido, com alta recorrência de estirpes urease positivas;
- ✓ Algumas cepas de *V. coralliilyticus* e *V. mimicus* apresentaram múltipla resistência associada a extenso perfil preliminar de virulência, sendo, portanto, espécies que merecem atenção no ambiente marinho e estuarino quanto a possível patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB' SABER, A. N. Paineis das interferências antrópicas na fachada atlântica do Brasil – Litoral e retroterra imediata. In: Simpósio de ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira, 2., 1990, Águas de Lindóia. **Anais ... Águas de Lindóia: Aciesp**, 1990, p. 1-24.
- ABBOTT, S. L.; JANDA, J. M. Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae* infection: report of two cases and review. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.18, n.3, p. 310–312, Mar. 1994.
- ABDALLAH, F. B.; KALLEL, H.; BAKHROUF, A. Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 191, n. 6, p. 493-500, June 2009.
- AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENIO, F. A review of extracellular virulence product *Vibrio* species important in diseases of cultivated shimp. **Aquac. Res.**, Oxford, v. 35, n.15, p. 1395-1404, Dec 2004.
- AKOND, M. A.; HASSAN, S. M. R.; ALAM, S.; SHIRIN, M. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. **Am. J. Environ. Sci.**, Washington, v. 5, n. 1, p. 47-52, Jan-Mar. 2009.
- ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T. S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. **Int. J. Food. Sci. Technol.**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 139-155, Apr 1998.
- ALP; S.; ARIKAN, S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. **J. Basic. Microbiol.**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 331-337, Oct 2008.
- ALVAREZ, J. D., AUSTIN; ALVAREZ, B. A. M.; REYES, H. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 313– 316, July 1998.
- ALVES JUNIOR, N.; MAIA NETO, O. S.; SILVA, B. S. O.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; CASTRO, C. B.; PARANHOS, R.; BITNER-MATHÉ, B. C.; KRUGER, R. H.; VICENTE, A. C. P.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 90-95, Feb 2010.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish**, 4th. Goldaming: Springer Praxis, 2007. 594p.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X. H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 119-124, Aug 2006.
- BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; PIANETTI, R.; BRUSCOLINI, F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. **Food Microbiol.**, London, v. 18, n. 5, p. 479-488, Oct 2001.

BAFFONE, W.; VITTORIA, E.; CAMPANA, R.; CITTERIO, B.; CASAROLI, A.; PIERFELIEI, L. Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in vitro and in vivo systems. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 5, p. 451-457, June 2005.

BAI, F.; PANG, L.; QI, Z.; CHEN, J.; AUSTIN, B.; ZHANG, X. H. Distribution of five vibrio virulence-related genes among *Vibrio harveyi* isolates. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, London, v. 54, n. 1, p. 71-78, Mar 2008.

BARAN, E.; HAMBREY, J. Mangrove conservation and coastal management in Southeast Asia: What impact on fishery resources. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 37, n.8-12, p.431-440, Aug- Dec 1999.

BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KEUHN, I.; MEOLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2748-2753, June 1999.

BARBOSA, L. M. **Recuperação de Áreas Degradadas da Serra do Mar e Formações Florestais Litorâneas**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2000, 138 p.

BARROS, H. M.; ESKINAZI-LEÇA, S. J.; MACEDO, S. J.; LIMA, T. **Gerenciamento participativo de estuários e manguezais**. Recife: Editora Universitária da UFPE. 2000. 38 p.

BATT, A. L.; AGA, D. S. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. **Anal. Chem.**, Washington, v. 77, n. 10, p. 2940-2947, May 2005.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSENBERG, E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 53, n. 1, p. 309-315, Jan 2003.

BEN-HAIM, Y.; ZICKERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4236-4242, July 2003.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 153, Suppl. 1, p. S347-S357, Mar 2008.

BENTIVOGLIO, M.; PACINI, P. Filippo Pacini: A determined observer. **Brain Res. Bull.**, New York, v. 38, n. 2, p. 161-165, Mar 1995.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, Jul-Ago 2003.

BLAKE, P. A. Vibrios on the half-shell: what the walrus and the carpenter didn't know. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 99, n. 4, p. 558-559, Apr 1983.

BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Int. J. Antimicrob. Agent.**, London, v. 14, n. 4, p. 327–335, May 2000.

CANO-GOMEZ, A.; BOURNE, D. G.; HALL, M. R.; OWENS, L.; HOJ, L. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 287, n. 1-2, p. 1–10, Feb 2009.

CARLUCCI, A. F.; PRAMER, D. Factors affecting the survival of bacteria in sea water. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 7, n. 6, p. 388-392, Nov 1959.

CARNEIRO, D. O., FIGUEIREDO H. C. P., PEREIRA JÚNIOR, D. J., LEAL, A. G., LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 869-876, Ago 2007.

CERVINO, J. M.; HAYES, R. L.; POLSON, S. W.; POLSON, S. C.; GOREAU, T. J.; MARTINEZ, R. J.; SMITH, G. W. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to Yellow Blotch/Band disease in Caribbean corals. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, n. 11. p. 6855–6864, Nov 2004.

CHAO, G.; JIAO, X.; ZHOU, X.; YANG, Z.; HUANG, J.; ZHOU, L.; QIAN, X. Distribution, prevalence, molecular typing and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 10, p. 907-912, Oct 2009.

CHOPRA, I.; HAWKEY, P. M.; HINTON, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 29, n.3, p. 245–277, Mar 1992.

CHOPRA, I; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 65, n. 2, p. 232-260, June 2001.

CHOWDHURY, M. A.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. **Infect Immun.**, Washington, v. 58, n. 12, p. 4159–4162, Dec 1990.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

COLARES, L. P. **Efeito da água do mar sobre a atividade de agentes antimicrobianos frente a cepas de *Vibrio* spp. isoladas de hemolinfa de camarão cultivado no estado do Ceará-Brasil**. 2010. 34 f. Monografia (Engenharia de Pesca), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; SAKER-SAMPAIO, S. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, Set 2006.

COURVALIN, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v. 38, n. 7, p. 1447-1451, July 1994.

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

DALSGAARD, I., GUDMUNSDOTTIR, B. K.; HELGASON, S.; HØIE, S.; THORESEN, O. F.; WICHARDT, U. P.; WIKLUND, T. Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 999-1006, June 1998.

DAVIS, B. R.; FANNING, G. R.; MADDEN, J. M.; STEIGERWALT, A. G.; BRADFORD, H. B., SMITH, H. L.; BRENNER, D. J. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 14, n. 6, p. 631-639, Dec 1981.

DAVIS; B. M.; WALDOR, M. K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholera*. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 35-42, Feb 2003.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W. Probióticos como alternativas anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da ABCC**, Recife, v. 2, n.4, p. 58-59, June 2005.

DEL MAR, C. Sore throats and antibiotics. **BMJ**, London, v. 320, n. 7228, p. 130-131, Jan 2000.

DEPAOLA, A.; CAPERS, G. M.; ALEXANDER, D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 3, p. 984–988, Mar 1994.

DEPAOLA, A.; HOPKINS, L. H.; PEELER, J. T.; WENTZ, B.; MCPHEARSON, R. M. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, n. 8, p. 2299–2302, Aug 1990.

DEPAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; BOWERS, J. C.; COOK, D. W. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997, 1998). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4649–4654, Nov 2000.

DEPARDIEU, F. I. P.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 20, n. 1, p. 79-114, Jan 2007.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 340-351, June 2003.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – *Vibrio***. Disponível em:

<<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/vibrio.html>> Acesso em: 21 Jan 2011.

ELLISON, R. K.; MALNATI, E.; DEPAOLA, A.; BOWERS, J.; RODRICK, G. E. Populations of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters from Florida using two methods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 682-686, May 2001.

FARMER III, J. J.; JANDA, J. M.; BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; BIRKHEAD, K. M. Genus 1. *Vibrio* Pacini 1894, 411^{AL}. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., v. 2. The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria. Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. editors, 2005. P. 494-456.

FARUQUE, S. M.; ALBERT, M. J.; MEKALANOS, J. J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol Mol Biol Rev.**, New York, v. 62, n. 4, p. 1301-1314, Dec 1998.

FASANO, A.; BAUDRY, B.; PUMPLIN, D. W. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin which affects intestinal tight junctions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 88, n. 12, p. 5242-5246, June 1991

FERNANDES, A. **Fitogeografia brasileira – Províncias florísticas**. 3. ed. Fortaleza: Realce, 2006. 253 p.

FERRINI, A. M.; MANNONI, V.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; CROCI, L. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. **Food Anal. Meth.**, Bethesda, v. 1, n. 3, p. 164–170, Sep 2008.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.*, Paris, v. 10, n. 4, p. 272-288. Apr 2004.

FURNISS, A. L.; LEE, J. V.; DONOVAN, T. J. The *Vibrio*. **Monograph Series**, London: Public Health Laboratory Service. 1979. 58 p.

FURUSHITA, M.; OKAMOTO, A; MAEDA, T.; OHTA, M.; SHIBA, T. Isolation of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a marine fish farm. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5598-5600, Sep 2005.

GARAU, J. Beta-lactamases: current situation and clinical importance. **Intensive Care Med.**, Thousand Oaks, v. 20, Suppl. 3, p. S5-S9, July 1994.

GOEL, A. K.; PONMARIAPPAN, S.; KAMBOJ, D. V.; SINGH, L. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae*. **Folia Microbiol.**, Praha, v. 52, n. 1, p. 81–85, Jan 2007.

GONI, M. A.; TEIXEIRA, M. J.; PERKLEY, D. W. Sources and distribution of organic matter in a river-dominated estuary (Winyah Bay, SC, USA), **Estuar. Coast. Shelf Sci.**, London, v. 57, n. 5-6, p. 1023–1048, Aug 2003.

HANNAH, E.L; ANGULO, F. J.; JOHNSON, J. R.; HADDADDIN, B.; WILLIAMSON, J.; SAMORE, M. H. Drug-resistant *Escherichia coli*, Rural Idaho. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 11, n. 10, p. 164-1617, Feb 2005.

HARRIS, L. J.; OWENS, L. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. **Dis. Aquat. Org.**, v. 38, n. 1, p. 11–22, Oct 1999.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A. A.; JOICE, G. J.; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 131-134, Feb 2005.

HEDLUND, B. P.; STALEY, J. T. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov, a marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) – degrading bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 51, n. 1, p. 61–66, Jan 2001.

HERZ, R. **Manguezais do Brasil**. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 1991. 227p.

HISPANO, C.; NEBRA Y.; BLANCH, A. Isolation of *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.**, London, v. 17, n. 3-4, p. 104–107. June 1997

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 174-175, Jun 1983.

HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGSTSSON, B.; 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, Apr 2003.

HONDA, S. I.; GOTO, I.; MINEMATSU, I.; IKEDA, N.; ASANO, N. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. **Lancet**, London, v. 8528, n. 1, p. 331-332, Feb 1987.

HONDA, T.; LIDA, T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct haemolysin and related haemolysins. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 4, n. 2, p. 106–113, Apr 1993.

HONDA, T., NI, Y. X.; MIWATANI, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infect. Immun.**, Washington, v. 56, n. 4, p 961-965, Apr 1988.

HOSSEINI, H.; CHERAGHALI, M. A.; YALFANI, R.; RAZAVILAR, V. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 187–190, Apr 2004.

HUSS, H. H. Assurance of Seafood Quality. Rome: FAO, Fisheries Technical Editors. Paper nº 334, 1994. 169 p.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: An unending threat to public health in developing countries. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 159, n. 7-8, p 495-506, Sep-Oct 2008.

INTARAPRASONG, A.; KHEMAYAN, K.; PASHARAWIPAS, T.; FLEGEL, T.W. Species-specific virulence of *Vibrio harveyi* for black tiger shrimp is associated with bacteriophage-mediated hemocyte agglutination. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 3-4, p. 185–192, Nov 2009.

JIRAVANICHPAISAL, P.; MIYAZAKI, T.; LIMSUWAN, C. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health**, Bethesda, v. 6, n. 1, p. 27-35, Jan 1994.

JONES, A. B.; DENNISON, W. C.; PRESTON, N. P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and microalgae absorption: a laboratory scale study. **Aquaculture**, Amsterdam, v.193, n.1-2, p.155-178, Feb 2001.

- KARUNASAGAR, I.; PAI, R.; MALATHI, G. R.; KARUNASAGAR, I. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 128, n. 3-4, p. 203-209, Dec 1994.
- KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, London, v. 15, n. 5, p. 308-320, Sep 2004.
- KAYSNER, C. A.; ABEYTA, C.; STOTT, R. F.; KRANE, M. H.; WEKELL, M. M. Enumeration of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, from samples of an oyster growing area, Grays Harbor, Washington. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 53, n. 4, p. 300-301, June 1990.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecol. Indic.**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-13, Jan 2008.
- KISHISHITA, M., MATSUOKA, N., KUMAGAI, K., YAMASAKI, S., TAKEDA, Y., NISHIBUCHI, M. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2449-2457, Aug 1992.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v. 46, n. 1, p. 165-170, July 1983.
- KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 317-322, Aug 2003.
- KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 1203-1214, Dec 2003.
- LACERDA, L. D. Os manguezais do Brasil. In: _____. Os manguezais e nós: Uma síntese de percepção. São Paulo: Edusp, 1999. cap. 12, p186-186.
- LAFISCA, A.; PEREIRA, C. S.; GIACONNE, V.; RODRIGUES, D.P. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 199-202, June 2008.
- LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. **Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood.** Institute of Environmental Science & Research Limited, 2003.
- LAMBS, L.; VENTURINI, M.; DECOCK-LE REVEREND, B.; KOZLOWSKI, H.; BERTHON, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 8. Potentiometric and spectroscopic studies on the formation of Ca(II) and Mg(II) complexes with 4-dedimethylamino-tetracycline and 6-desoxy-6-demethyl-tetracycline. **J. Inorg. Biochem.**, New York, v. 33, n. 3, p. 193-210, July 1988.
- LEE, K. K.; LIU, P. C.; CHEN, Y. L. Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*. **Electrophoresis**, Berlin, v. 20, n. 17, p. 3343-3346, Nov 1999.

LEE, K. K.; LIU, P. C.; KOU, G. H.; CHEN, S. N. Investigation on the major exotoxin of *Vibrio harveyi* 770527 isolated from diseased *Penaeus monodon*. **Rep. Fish Dis. Res.**, New York, v. 18, n. 1, p. 33–42, Jan 1997.

LEVY, S. B. The challenge of antibiotic resistance. **Sci. Am.**, New York, v. 278, n. 3, p. 46-53, Mar 1998.

LIGHTNER, D. V. Disease of penaeid shrimp. In: _____. **Handbook of mariculture**. Boca Ratón: CRC Press, 1993. cap. 13, p. 393-486.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, P. C. H.; FARIA, F. C.; PICOLLI, R. H.; FILHO, J. S. S. B.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciênc. Agrotecnol.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, Jan-Fev 2005.

LIU, P. C., LEE, K. K., CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in Tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 413-416, June 1996.

LOURENÇO, S.; MARQUES JÚNIOR, A. N. Produção Primária Marinha. In: _____. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2002. cap. 1, p. 12-36.

LUNESTAD, B. T.; SAMUELSEN, O.B. Effects of sea water on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture; implications for MIC testing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 319-323, May 2001.

LUNESTAD, B.T.; GOKSOYR, J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. **Dis. Aquat. Organ.**, Oldendorf, v. 9, n. 1, p. 67-72, Aug 1990.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2004. 610p.

MANNING, P. A.; STROEHER, U. H.; KARAGEORGOS, L. E. BROWN, M. H.; MORONA, R. A putative pathway for perosamine biosynthesis is the first function encoded within the rfb region of *Vibrio cholera* O1. **Gene**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 33-42, Dec 1995.

MATSUMOTO, C.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMMAMURTHY, T.; WONG, H. C.; DEPAOLA, A.; KIM, Y. B.; KIM, Y. B.; ALBERT, M. J.; NISHIBUCHI, M. Pandemic spread of an O3 : K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 2, p. 578-585, Feb 2000.

MENEZES, F. G. R. **Diversidade de *Vibrio* spp. em estuários no estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura**. 84 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais), Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MERON, D.; EFRONY, R.; JOHNSON, W. R.; SCHAEFER, A. L.; MORRIS, P.J.; ROSENBERG, E.; GREENBERG E. P.; BANIN, E. Role of Flagella in Virulence of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v. 75, n. 17, p. 5704-5707, Sep 2009.

MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, S.; AKIYAMA, S.; TAKIZAWA, K.; YAMAI, S. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 100, n. 2, p. 1147-1149, Jan 1969.

MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 213, n. 2, p. 7-12, Feb 2002.

MONTERO, A. B., AUSTIN, B. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). **J. Fish Dis.**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 377-386, Sep 1999.

MORENO, M. L. G.; LANDGRAF, M. Virulence Factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 84, n. 5, p. 747-751, May 1998.

MURRAY, B. E.; MOELLER R. C. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. **Med. Clin. North Am.**, v. 62, n. 5, p. 899-923, Sep 1978.

MURRAY, P. R. *Vibrio, Aeromonas e Plesiomonas*. In: _____. **Microbiología Médica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 30, p. 265-271.

NIKAIDO, H.. Multidrug resistance in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 78, n. 1, 119-146, Jan 2009.

NISHIBUCHI, M.; FASANO, A.; RUSSELL, R.; KAPER, J. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 9, p. 3539-3545, Sep 1992.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 175-185, July 2008.

NWOSU, V. C. Antibiotic Resistance with Particular References to Soil Microorganisms. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v. 152, n. 5, p. 421-430, June 2001.

OKUMURA, J.; KAI, T.; HAYATI, Z.; KARMIL, F.; KIMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Antimicrobial Therapy for Water-Associated Wound Infections in a Disaster Setting: Gram-Negative Bacilli in an Aquatic Environment and Lessons from Banda Aceh. **Prehosp. Dis. Med.**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 189-196, May-June 2009.

PAGES J.M. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. **Med. Sci.**, Paris, v. 20, n. 3, p. 346-351, Mar 2004.

PAINTING, S. J.; DEVLIN, M. J.; MALCOLM, S. J.; PARKER, E. R.; MILLS, D. K.; MILLS, C.; TETT, P.; WITHER, A.; BURT, J.; JONES, R.; WINPENNY, K. Assessing the impact of nutrient enrichment in estuaries: susceptibility to eutrophication. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 55, n. 1-6, p.74-90, Jan-Mar 2007.

PASS, D. A.; DYBDAHL, R.; MANNON, M. M. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in the Western Australia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 149-169, Sep 1987.

PASSONE, S.; DAS, D. B.; NASSEHIL, V.; BIKANGAGA, J. H. Design of discharge policies multiple effluent sources and returning pollutants scenarios in a branching estuary. **Estuar. Coast. Shelf Sci.**, London, v. 56, n. 2, p.227-237, Feb 2003.

PAYNE, M.; OAKLEY, J.; OWENS, L. The ability of two different *Vibrio* spp. bacteriophages to infect *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 663–672, Apr 2004.

PEREIRA JÚNIOR, 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. **Cienc. Agrotecnol.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, Nov-Dez 2006.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n.1, p. 56-59, Jan-Fev 2007.

PFEFFER, C. S.; HITE, M. F.; OLIVER, J. D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of Eastern North Carolina. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington. v. 69, n. 6, p. 3526-3531, June 2003.

PIZZELLA, D. G.; SOUZA, M. P. Análise da sustentabilidade Ambiental do Sistema de Classificação das águas doces superficiais brasileiras. **Eng. Sanit. Amb.**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 139-148, Fev 2007.

PIZZUTO, M.; HIRST, R. G. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. **Dis. Aquat. Org.**, Oldenford, v. 21, n. 3, p. 61–68, May 1995.

RAHMAN, M.; KÄLLSTRÖM, H.; NORMARK, S.; JONSSON, A.B. PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. **Mol. Microbiol.**, Malden, v. 25, n. 1, p. 11-25, July 1997.

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.

REED, L.; SIEWICKI, T.; SHAH, J. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 11-28, Apr 2004.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Mem. I. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 589-592, Oct-Dez 1993.

ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1063, n. 1, p. 222-230, Jan 2005.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, C. GOMEZ-GIL, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 383-387, May 2001.

RUST, L. MESSING, C. R.; IGLEWSKI, B. H. Elastase assays. **Methods Enzymol.**, Washington, v. 235, n.1, p. 554-562, Feb 1994.

SAAVEDRA, M. J.; BRITO, R. D.; SOUSA, M.; ALVES, A.; REMA, P. Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Susceptibilidade a diferentes grupos de antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 277-279, Fev 2004.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CITRÓN-MOLERO, G. Manguezais brasileiros: Uma síntese sobre aspectos históricos (séculos XVI a XIX), zonação, estrutura e impactos ambientais. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, 3., 1994, São Paulo, **Anais ...** São Paulo: Aciesp, 1994, p. 333-41.

SCHMIEGELOW, J. M. M. **O Planeta Azul – Uma Introdução às Ciências Marinhas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 202 p.

SHAH, P. D.; DEOKULE, J. S. Isolation of *Vibrio mimicus* from a case of acute diarrhea: a case report. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, Chandigarh, v. 49, n. 3, p. 455-456, July 2006.

SHANDERA, W. X.; JEFFREY, J. M.; JOHNSTON, M.; DAVIS, B. R.; BLAKE, P. A. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 99, n. 2, p. 169-171, Feb 1983.

SHI, L.; MIYOSHI, S.; HIURA, M.; TOMOCHIKA, K.; SHIMADA, T.; SHINODA, S. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE), and heat stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 42, n. 12, p. 823-828, Dec 1998.

SHINODA, S.; NAKAGAWA, T.; SHI, L.; BI, K.; KANO, Y.; TOMOCHIKA, K.; MIYOSHI, S.; SHIMADA, T. Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 48, n. 7, p. 547-551, July 2004.

SHIRAI, H.; ITO, H.; HIRAYAMA, T.; NAKAMOTO, Y.; NAKABAYASHI, N.; KUMAGAI, K.; TAKEDA, Y.; NISHIBUCHI, M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct haemolysin (TDH) and TDH-related haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 58, n. 11, p. 3568-3573, Nov 1990.

SMITH, P. Towards the establishment of a breakpoint concentration for the determination of resistance to oxolinic acid in marine microflora. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 229-239, July 1998.

SULTAN, Z.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Presence of LuxS/AI-2 based quorum-sensing system in *Vibrio mimicus*: *luxO* controls protease activity. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 407-417, May 2007.

SUTHIENKUL, O.; IIDA, T.; PARK, K. S.; ISHIBASHI, M.; SUPAVEJ, S.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T. Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1293-1295, May 1996.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos** – 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1122p.

TENDENCIA, E. A.; DE LA PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, n.1-4, p. 1-13, Oct 2002.

THOMPSON, F. L.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403–431, Sep 2004.

TORKILDSEN, L.; SAMUELSEN, O.B.; LUNESTAD, B.T., BERGH, Ø. Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 185, n. 1-2, p. 1-12, May 2000.

TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – A review. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Bethesda, v. 17, n. 3-4, p. 170-178, Mar 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed - Revisada e atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

UNO, K.; AOKI, T.; KLEECHAYA, W.; TANASOMWANG, V.; RUANGPAN, L. Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues. **Aquaculture**, Amsterdam, v.254, n. 1-4, p.24-31, Apr 2006.

VANDENBERGHE, J.; LI, Y.; VERDONCK, L.; LI, J.; SORGELOOS, P.; XU, H. S.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 121–132, Nov 1998.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, T.; CHEN, J. C. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 285-291, Oct 2005.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 35, n. 5, p. 570–575, Sep 2002

VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V.; COSTA, R. A.; TEOPHILO, G. N. D.; MACRAE, A.; FONTELES FILHO, A. A.; RODRIGUES, D. P. Raw oysters can be a risk for infections. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 14, n. 1, p. 66-70, Jan 2010.

VIZCAINO, M. I.; JOHNSON, W. R.; KIMES, N. E.; WILLIAMS, K.; TORRALBA, M.; NELSON, K. E.; SMITH, G. W.; WEIL, E.; MOELLER, P. D. R.; MORRIS, P. J. Antimicrobial Resistance of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus* and Caribbean Sister Phylotypes Isolated from a Diseased Octocoral. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 646-657. Feb 2010.

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, June 2007.

WONG, H. C.; LIU, S. H.; KU, L. W.; LEE, I. Y.; WANG, T. K.; LEE, Y. S.; LEE, C. L.; KUO, L. P.; SHIH, D. Y. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 63, n. 7, 900–906, July 2000.

ZHONG, Y.; ZHANG, X. H.; CHEN, J.; CHI, Z.; SUN, B.; LI, B.; AUSTIN, B. Overexpression, Purification, Characterization, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Hemolysin VHH. **Infect. Immun.**, Washington, v. 74, n. 10, p. 6001-6005, Oct 2006.

ANEXO

Soluções, Reagentes e Meios de Cultura

Ágar Trypticase soja com 1% de cloreto de sódio (TSA 1%)

Ágar Trypticase-Soja (TSA)	40 g
Cloreto de sódio (NaCl)	10 g
Água destilada	1.000 mL

Foram suspensos 40 g de Ágar TSA (Difco) e 10 g de cloreto de sódio (Vetec) para cada 1.000 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para $7,8 \pm 0,2$. O meio foi fundido até completa homogeneização e distribuído no volume de 5 mL em tubos de ensaio. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após esterilização, os tubos foram inclinados em rampa.

Solução salina a 1% de cloreto de sódio (NaCl)

Cloreto de sódio (NaCl)	10 g
Água destilada	1.000 mL

Foram suspensos 10 g de NaCl (Vetec) para cada 1.000 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para $7,8 \pm 0,2$. Nos tubos, foram distribuídos volumes de 9 mL e, posteriormente autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Ágar Tiosulfato Citrato Bile e Sacarose (TCBS)

Ágar TCBS	89 g
Água destilada	1.000 mL

De acordo com as recomendações do fabricante (Difco), foram dissolvidos por aquecimento, 89 gramas do meio desidratado em 1.000mL de água destilada. Em seguida, distribuído, ainda quente, em volumes de 15 mL, em placas de Petri esterilizadas e após sua solidificação, as placas foram utilizadas. O pH final deste meio foi de $8,6 \pm 0,2$.

Ágar Triptona Soja (TSA) com 1% de NaCl

Ágar TSA	40 g
Cloreto de sódio	1 g
Água destilada	1.000 mL

À água destilada foram adicionados os ingredientes que eram misturados e a solução fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio, de forma a se ter uma base de aproximadamente 2 cm de altura e uma parte inclinada. Após a solidificação do meio, eram mantidos em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de $7,8 \pm 0,2$.

Caldo Triptona Soja (TSB) com 1% de NaCl

Caldo triptona-soja	30 g
Cloreto de sódio	1 g
Água destilada	1.000 mL

À água destilada foram adicionados os ingredientes e distribuídos em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm, seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de $7,8 \pm 0,2$.

Ágar Mueller-Hinton com 1% de NaCl

Ágar Mueller Hinton	28 g
Cloreto de sódio	1 g
Água destilada	1.000 mL

Os ingredientes foram misturados e agitados por aproximadamente 1 minuto. Em seguida o meio foi aquecido até a sua completa dissolução e levado à esterilização por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Distribuição de 15 mL por placas de Petri estéril. O pH final deste meio foi de $7,3 \pm 0,1$.

Caldo Mueller-Hinton com 1% de NaCl

Caldo Mueller-Hinton (Difco)	21 g
Cloreto de sódio	1 g
Água destilada	1.000 mL

Os ingredientes foram misturados por aproximadamente 1 minuto para completa dissolução do pó. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de $7,3 \pm 0,1$.

Ágar Mueller-Hinton com água do mar a salinidade 20

Ágar Mueller Hinton	28 g
Água do mar a salinidade 20.....	1.000 mL

Os ingredientes foram misturados e agitados por aproximadamente 1 minuto. Em seguida o meio foi aquecido até a sua completa dissolução e levado à esterilização por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Distribuição de 15 mL por placas de Petri estéril. O pH final deste meio foi de $7,8 \pm 0,2$.

Caldo Mueller-Hinton com água do mar a salinidade 20

Caldo Mueller Hinton (Difco)	21 g
Água do mar (salinidade 20)	1.000 mL

Os ingredientes foram misturados por aproximadamente 1 minuto para completa dissolução do pó. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de $7,8 \pm 0,2$.

Caldo Luria Bertani 1% (p/v) de NaCl

Triptona.....	10 g
Extrato de carne	5,0 g
Cloreto de Sódio	10 g
Ágar	15g

À água destilada foram adicionados os ingredientes que eram misturados e a solução fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de $7,8 \pm 0,2$.

Caldo Luria Bertani 1% (p/v) de NaCl, acrescido de 100 µg/mL de Acridine Orange

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	10 g
Acridine Orange	0,1 g
Água destilada	1.000 mL

Foram suspensos 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 0,1 g de *acridine orange* (SIGMA), homogeneizados para cada 1.000 mL de água destilada. O meio foi distribuído em volumes de 1 mL por tubo. Após, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Ágar Wagatsuma

Extrato de levedura	3 g
Peptona	10 g
Fosfato de potássio dibásico	5 g
Manitol	10 g
Cristal violeta 0,1%	0,1 mL
Cloreto de sódio	70 g
Ágar	15 g
Sangue a 20% de eritrócitos	100 mL
Água destilada	1.000 mL

Os reagentes e meios de cultura, à exceção da solução de sangue a 20% de eritrócitos, foram suspensos para 1.000 mL de água destilada de acordo com as proporções recomendadas. Após, o pH foi ajustado para $8,0 \pm 0,2$. A solução foi fundida até completa dissolução e mantida em banho-maria a 50°C sem autoclavar. Posteriormente, 100 mL da solução de sangue a 20% de eritrócitos foram adicionados em 1.000 mL do meio e, imediatamente, distribuído em placas de petri esterilizadas no volume de 15 mL.

Meio de cultura para o teste da elastase

Para o preparo da camada base, suspendeu-se 8 g de caldo nutriente (Oxoid), 20 g de Ágar Noble (Difco) e 10 g de cloreto de sódio (Vetec). O meio teve pH ajustado para $7,5 \pm 0,1$ e, posteriormente, foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após, o meio foi mantido a 50°C , distribuído em placas e armazenado a 4°C por 24 h. Para o preparo da camada de cobertura foram suspensos 2,4 g de caldo nutriente (Oxoid), 6 g de ágar noble (Difco) e 1 g de elastina do ligamento do pescoço de boi (Sigma E1625) para cada 300 mL de água destilada. O meio teve seu pH ajustado para $7,5 \pm 0,1$ e, posteriormente, foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após, foi distribuído nas placas com camada base preparada um dia antes, cobrindo-a com cerca de 5 mL.

Meio de cultura para o teste da lipase

Para cada 1.000 mL de ágar TSA a 1% (p/v) de cloreto de sódio foram adicionados 10 mL de Tween 80, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. O meio foi distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Meio de cultura para o teste da fosfolipase

Foram preparados 1.000 mL de ágar TSA a 1% (p/v) de cloreto de sódio, esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após, o meio foi mantido a 50°C, sendo adicionado 10 mL de emulsão de gema de ovo. O meio foi distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Meio de cultura para o teste da gelatinase

Para cada 1.000 mL de ágar TSA a 1% (p/v) de cloreto de sódio foram adicionados 10 g de gelatina (Difco) e esterilizados a 121°C por 15 min. O meio foi distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Meio de cultura para o teste da amilase

Foram preparados 1.000 mL de ágar nutriente a 1% (p/v) de cloreto de sódio, esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após, o meio foi mantido a 50°C, sendo adicionado 10 mL de emulsão de gema de ovo. O meio foi distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Meio de cultura para o teste da caseinase

Para cada 1.000 mL de ágar TSA a 1% (p/v) de cloreto de sódio foram adicionados 5 g de leite em pó desnatado (Molico) e esterilizados a 121°C por 15 minutos. O meio foi distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Ágar DNase

De acordo com as recomendações do fabricante, foram suspensos 42 g de ágar DNase (Difco) e homogeneizados para cada 1.000 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri no volume de 15 mL.

Caldo ureia a 1% (p/v) de cloreto de sódio

De acordo com as recomendações do fabricante, foram suspensos 29 g de caldo uréia (Difco) e homogeneizados para cada 1000 mL de água destilada. O meio foi distribuído em tubos de ensaio no volume de 1 mL e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Preparo do corante cristal violeta (2%) (Coloração de Gram)

-Solução A:

Cristal violeta (85% puro)	2 g
Álcool etílico (95%)	20 mL

-Solução B:

Oxalato de amônio	0,8 g
Água destilada	80 mL

As soluções A e B foram misturadas e reservadas em frasco de cor âmbar, acondicionadas sob refrigeração (4°C).

Preparo do corante lugol (Coloração de Gram)

- Iodo cristalizado 1 g
- Iodeto de potássio 2 g
- Água destilada 300 mL

Os reagentes foram misturados e reservados em frasco de cor âmbar, acondicionados sob refrigeração (4°C).

Preparo do corante safranina (0,25 %) (Coloração de Gram)

- Safranina (2,5% em álcool a 96%) 10 mL
- Água destilada 100 mL

Os reagentes foram misturados e reservados em frasco de cor âmbar, acondicionados sob refrigeração (4°C).

Preparo da solução de MacFarland 0,5

Foram adicionados 0,5 mL de cloreto de bário ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 48 mM em 99,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,36 N. Estocagem em vidro escuro.