



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

**RAYZA LIMA ARAÚJO**

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENTÉRICAS EM SÍTIOS ANATÔMICOS E  
LÍQUIDO INTERVALVAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E  
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli***

**FORTALEZA**

**2013**

**RAYZA LIMA ARAÚJO**

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENTÉRICAS EM SÍTIOS ANATÔMICOS E  
LÍQUIDO INTERVALVAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E  
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Tecnologia e Microbiologia do Pescado.

Orientador: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Co-orientador: Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

**FORTALEZA**

**2013**

**RAYZA LIMA ARAÚJO**

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENTÉRICAS EM SÍTIOS ANATÔMICOS E  
LÍQUIDO INTERVALVAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E  
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Tecnologia e Microbiologia do Pescado.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profa. Dra. Renata Albuquerque Costa  
Faculdade do Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Aos meus pais, Petronilia e Édes.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Petronilia e Édes, pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo durante estes dois anos, mesmo apesar da distância se fizeram próximo pelas palavras e amor.

À minha tia Olinidina, minha mãe em Fortaleza, e minha irmã Emly, pelas palavras e conversas, apoio e incentivo nos melhores e piores momentos.

Ao Jesse pelo amor, apoio e compreensão, e pela ajuda nas coletas e fins de semana de trabalho.

À Professora Dra. Oscarina Viana de Sousa pela oportunidade de orientação, pela sua contribuição com ideias valiosas para o enriquecimento do projeto, e pela compreensão, atenção e disponibilidade.

À Professora Dra. Regine Vieira pela iniciação na ciência da microbiologia, pela contribuição para o projeto, pelos ensinamentos, exemplo de vida e pelo carinho dispensado em palavras e gestos.

À minha querida co-orientadora Gleire, pela atenção, carinho, amizade e compreensão, pela disponibilidade de ajuda na pior fase do meu mestrado, e por sempre estar disponível.

Aos queridos Alberto e Camilla Brandão, pela amizade, carinho, brincadeiras, pelo companheirismo em todos os momentos.

À Renata Costa pelo carinho, amizade e ajuda indispensáveis.

À Adalva, minha oráculo, pela ajuda na bancada e por dividir comigo as experiências, angústias e desespero com as queridas *E. coli*.

Ao Rafael, pela valiosa ajuda nos gráficos e em tantas outras questões, contribuindo significativamente com a minha escrita.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, pela receptividade e bons momentos de convivência, sempre mais recorrentes que os ruins.

Às amigas Tarciana e Lidiane, pela amizade e carinho, conversas e angústias compartilhadas na vida pessoal e científica.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

## RESUMO

Os coliformes termotolerantes têm sido descritos como um dos melhores indicadores de contaminação de ambientes aquáticos por resíduos humanos, sendo amplamente utilizado como parâmetro para classificação de áreas onde se cultiva ou extrai ostras. Dentre os membros deste grupo, a *Escherichia coli* se destaca como uma espécie potencialmente patogênica, representando risco para a saúde pública quando associada ao consumo de moluscos bivalves crus ou parcialmente cozidos. Entretanto, pouco é sabido sobre a colonização nos tecidos desses moluscos e/ou distribuição dessas bactérias entéricas. O presente estudo teve como objetivos: (i) quantificar coliformes termotolerantes do fluido corporal e dos sítios anatômicos, separadamente; (ii) isolar e identificar *E. coli* de amostras de ostras comercializadas *in natura* na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará; (iii) avaliar o perfil de virulência e resistência a antimicrobianos dos isolados de *E. coli*. Foram realizadas dez coletas no período de fevereiro a abril de 2012, sendo analisadas dez ostras por coleta, divididas em um fluido corporal (líquido intervalvar) e dois sítios anatômicos (músculo e trato gastrointestinal). Os resultados apontaram três amostras com contagens de coliformes acima do limite estabelecido pela legislação nº 12 de 2001 da ANVISA, tendo o líquido intervalvar apresentado o NMP mais elevado em seis amostras. Das 137 cepas de *E. coli* isoladas, verificou-se maior incidência de resistência à tetraciclina e oxitetraciclina (19%), com variação do Índice de Múltipla Resistência (MAR) entre 0,250 e 0,625. Observou-se ainda a presença de cepas produtoras de enzimas beta-lactamases de espectro estendido, porém nenhuma das cepas testadas apresentou produção de biofilme. A elevada frequência de resistência à oxitetraciclina sugere uma pressão seletiva sobre a microbiota do ecossistema manguezal, que pode ser afetada diretamente pela atividade de carcinicultura, praticada na região próxima à cidade de Parnaíba, localizada no Estado do Piauí, de onde as ostras são extraídas. Além disso, a presença de múltipla resistência aos antimicrobianos observada pode ser indicativa de risco para os consumidores de ostra *in natura*.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, ostras, virulência.

## ABSTRACT

Fecal coliforms have been described as one of the best indicators of pollution in the aquatic environments by human wastes, and it is widely used as a parameter for classifying areas where oysters are farmed or extracted. Among Enterobacteriaceae members, *E. coli* stands out as potential pathogenic specie, representing risk for public healthy when associated with consumption of raw or undercooked bivalves. However, little is known about this colonization in the bivalve tissues and/or distribution of these enteric bacteria. The objective of the present study was to: (i) quantify fecal coliforms from body fluid and anatomical sites, separately; (ii) isolate and identify *E. coli* in oysters commercialized *in natura* in Praia do Futuro beach, Fortaleza-Ceará; (iii) evaluate the virulence profile and resistance to antimicrobial agents of *E. coli* isolates. The study covered ten samples, from February to April 2012, by analyzing twelve oysters for sample, divided into a body fluid (intervalvar liquor) and two anatomical sites (mantle and gastrointestinal tract). Fecal coliforms concentration was higher than allowed by legislation nº 12/2001 of ANVISA in three samples, and intervalvar liquor presented higher MPN in six samples. Out of 137 *E. coli* strains isolated, 19% was resistant to both tetracycline and oxytetracycline, and MAR ranged from 0,250 to 0,625. It is further noted producing expended spectrum beta lactamases strains, however none showed biofilm production. The major frequency resistance to oxytetracycline suggests a selective pressure to mangrove ecosystem microbiota that could be directly affected by farming shrimp activity, practiced in a region next to Parnaíba city, located in Piauí state, where oysters are extracted. In addition, the presence of multiple resistance can be a risk for *in natura* oyster consumers.

**Key words:** *Escherichia coli*, oysters, virulence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia da ostra americana <i>Crassostrea virginica</i> .....	18
Figura 2 – Teste de aderência na superfície de vidro. A)Resultado negativo. B)Resultado positivo.....	35
Figura 3 – Visualização do resultado positivo (Teste 1) para produção de ESBL observado nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de ostras comercializadas <i>in natura</i> .....	53
Figura 4 – Visualização do resultado positivo (Teste 2) para produção de ESBL observado nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de ostras comercializadas <i>in natura</i> .....	54



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Contagens de coliformes termotolerantes expressas em NMP/100 g para as dez coletas de ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	41
Gráfico 2 –	Contagens de <i>E.coli</i> expressas em NMP/100 g para as dez coletas de ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	42
Gráfico 3 –	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza-CE.....	46
Gráfico 4 –	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das subpopulações de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza-CE.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Padrões para interpretação dos halos de inibição do antibiograma pelo teste de difusão em disco.....	33
Tabela 2 –	Quantificação de coliformes termotolerantes a 45°C (NMP/g ou mL e NMP/100 g) e <i>E. coli</i> (NMP/100 g) para amostras de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	37
Tabela 3 –	Resultados da Análise de Variância aplicada aos valores NMP/g de coliformes termotolerantes identificados no músculo e no trato gastrointestinal de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	39
Tabela 4 –	Perfil de isolamento e identificação das cepas oriundas das amostras de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	43
Tabela 5 –	Número de cepas de <i>E. coli</i> classificadas em sensíveis, intermediárias e resistentes frente aos respectivos antimicrobianos testados.....	45
Tabela 6 –	Padrões de multirresistência a antimicrobianos entre os isolados de <i>E. coli</i> de amostras de ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE .....	48
Tabela 7 –	Perfis de resistência entre os isolados crescidos como subpopulações dentro dos halos de sensibilidade no teste de difusão em disco.....	49
Tabela 8 –	Número de cepas de <i>E. coli</i> , oriundas de amostras de ostra <i>in natura</i> , classificadas de acordo com a potencial origem do fenótipo de resistência.....	51
Tabela 9 –	Número de subpopulações de <i>E. coli</i> , oriundas de amostras de ostra <i>in natura</i> , classificadas de acordo com a potencial origem do fenótipo de resistência.....	52
Tabela 10 –	Resultados dos testes para detecção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido entre os isolados de <i>E. coli</i> oriundos de diferentes estruturas do corpo das ostras comercializadas <i>in natura</i> em Fortaleza – CE.....	53

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	16
3.1	Ecosistemas estuarinos.....	16
3.2	Cultivo de ostra.....	17
3.3	Micro-organismos presentes em ostras .....	19
3.4	A importância de coliformes e <i>E. coli</i> como contaminantes.....	21
3.5	Uso de antimicrobianos .....	23
3.5.1	Mecanismos de resistência .....	23
3.5.2	Enzimas beta-lactamases .....	24
3.6	Biofilmes.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1	Amostragem .....	28
4.2	Preparação das amostras .....	28
4.2.1	Fluido corporal - líquido intervalvar.....	28
4.2.2	Sítio Anatômico - músculo.....	28
4.2.3	Sítio Anatômico - trato gastrointestinal.....	29
4.3	Análises Bacteriológicas .....	29
4.3.1	Prova Presuntiva .....	29
4.3.2	Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	29
4.3.2.1	Produção de Indol e de H <sub>2</sub> S .....	30
4.3.2.2	Vermelho de metila (VM) .....	30
4.3.2.3	Voges-Proskauer (VP) .....	30
4.3.2.4	Citrato .....	30
4.3.3	Quantificação de coliformes termotolerantes e <i>E. coli</i> .....	31
4.3.4	Antibiograma .....	31
4.3.4.1	Cura plasmidial .....	33
4.3.4.2	Cálculo dos índices MAR e ARI .....	34
4.3.4.3	Subpopulações .....	34
4.3.4.4	Produção de ESBL .....	34
4.3.5	Teste de agregação .....	35

4.4	Análises estatísticas.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Os ambientes estuarinos ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, recebendo grandes quantidades de matéria orgânica carregadas pelos corpos de água doce. Além disso, sofrem influência direta da salinidade da água do mar, proporcionando, assim, a formação de um ecossistema especial de grande produtividade primária, destacando-se como berçário natural de muitas espécies de origem marinha (SCHMIEGELOW, 2004).

Associados aos estuários encontram-se os manguezais, formados por uma pequena variedade de espécies de plantas, com alta produção de matéria orgânica, e caracterizados como habitat de várias espécies de crustáceos e moluscos bivalves (NYBAKKEN; BERTNESS, 2005). Dentre os organismos endêmicos das regiões de manguezal, a ostra destaca-se como um dos recursos mais promissores para a maricultura, uma vez que seu cultivo não necessita administração de alimentação artificial, e é ambientalmente sustentável (GOMEZ; BAYONA, 2007).

A ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, destinada à comercialização pode advir da extração em bancos naturais ou do cultivo. Segundo Hernández, Troccoli e Millián (1998), esta é considerada uma das espécies com maior perspectiva para o desenvolvimento da aquicultura nos países tropicais da costa atlântica americana. Seu cultivo tem sido reportado em países da América Latina como, Venezuela (BUITRAGO *et al.*, 2005; LODEIROS-SEIJO; FREITES-VALBUENA, 2007), e Cuba (FRÍAS; RODRIGUES, 1991), que se destaca pela produção em larga escala (GOMEZ; BAYONA, 2007). No Brasil, esta atividade ainda é incipiente e está sendo desenvolvida em Estados das Regiões Nordeste, Sudeste e Sul (LENZ, 2008; MACCACHERO; GUZENSKI; FERREIRA, 2005; PEREIRA *et al.*, 2000). Estes autores têm conduzido pesquisas na tentativa de estabelecer uma tecnologia de cultivo mais avançada e com maiores resultados de produtividade.

Uma das medidas primordiais para a implantação da atividade é a escolha do local de cultivo, devendo ser livre de contaminação, uma vez que os moluscos são organismos filtradores e podem reter micro-organismos patogênicos (MAALOUF; POMMEPUY; GUYADER, 2010). Segundo Vieira (2004), os moluscos são organismos bioindicadores e refletem as condições dos ambientes aquáticos. Dessa forma, a quantificação de coliformes termotolerantes no músculo desses invertebrados tem sido utilizada como parâmetro para a classificação de áreas propícias à ostreicultura pela legislação dos Estados Unidos, União Europeia e, mais recentemente do Brasil.

O hábito de consumir ostras cruas aumenta o risco de veiculação de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), incluindo as de etiologia bacteriana. Esse quadro pode ser agravado se os moluscos forem provenientes de áreas contaminadas ou tratados sob condições higiênico-sanitárias precárias (MENDES *et al.*, 2004).

Dentre os micro-organismos que contaminam as ostras podem ser citados aqueles de origem endógena, pertencentes à microbiota do ambiente, como *Aeromonas sp.* e os víbrios, destacando-se *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, como espécies potencialmente patogênicas ao homem. Além disso, destacam-se os contaminantes do aporte de resíduos humanos nos corpos hídricos. Como micro-organismos alóctones de áreas de cultivo de ostras, citam-se os membros da família Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli*, responsáveis por inúmeros surtos de gastroenterite (AMAGLIANI; BRAND; SCHIAVANO, 2012; BRANDS *et al.*, 2005; GONZÁLEZ *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2007; RYU *et al.*, 2012).

Além de indicadoras da qualidade bacteriológica de alimentos e água, algumas estirpes de *E. coli* também apresentam mecanismos de virulência, o que as torna um risco para a saúde dos consumidores de ostras. Dentre estes fatores, destaca-se: a resistência aos antimicrobianos, que exercem uma pressão seletiva nos micro-organismos, tornando-se um problema emergente mundial (BLAKE *et al.*, 2003; FRENCH, 2005). Outro fator de virulência comumente associado a *E. coli* é a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que conferem resistência aos antimicrobianos beta lactâmicos, e podem ser transmitidos dos alimentos de origem animal para os seres humanos (ALEXANDER *et al.*, 2010; TURNIDGE, 2004). Ainda nesse sentido, relaciona-se as cepas produtoras de biofilme, que têm sido associadas à produção de diferentes mecanismos de patogenicidade, tornando essas bactérias ainda mais perigosas (BRADFORD, 2001).

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos (i) quantificar coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* no fluido corporal e nos sítios anatômicos, separadamente; (ii) isolar e identificar *E. coli* de amostras de ostras comercializadas *in natura* na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará, (iii) avaliar o perfil de virulência dos isolados quanto à resistência a antimicrobianos, à produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido e à formação de biofilme.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ecossistemas estuarinos

Os estuários podem ser definidos como uma província da zona costeira que sofre regimes energéticos diferentes de descarga de água doce, marés, ventos e ondas, apresentando uma relação restrita com o oceano adjacente (FONTELES-FILHO, 2011).

Estes ambientes caracterizam-se pela alta produtividade primária e pelo desenvolvimento de variados espécimes marinhos juvenis de peixes e crustáceos com alto valor comercial (PAIXÃO *et al.*, 2013). Algumas espécies completam seu ciclo de vida dentro dos estuários, como é o caso das ostras, mexilhões e caranguejos (RODRIGUEZ, 1972). De acordo com Datta, Chattopadhyay e Guha (2012), os estuários ainda contribuem para a ciclagem de nutrientes e proteção das zonas costeiras contra a erosão.

Associados a estes ecossistemas costeiros encontram-se os manguezais, compostos por uma vegetação com alta capacidade de produção primária e tolerância à salinidade do mar aberto (ODUM; BARRET, 2007). Esses ambientes são restritos às zonas tropicais e subtropicais e abrigam uma grande diversidade de organismos (BOUCHEZ *et al.*, 2012).

O Brasil apresenta um dos maiores ecossistemas de mangue do mundo, distribuindo-se desde o Oiapoque (Amapá) até Laguna (Santa Catarina), perfazendo um total de quase 1,4 milhões de hectares (REZENDE *et al.*, 2009). No Ceará, existem cerca de doze bacias hidrográficas que apresentam zonas de manguezais (FONTELES-FILHO, 2011), caracterizando-se como importante fonte de renda para as comunidades litorâneas que praticam a extração de diversos recursos pesqueiros destes ambientes (SABRY *et al.*, 2013).

Os ecossistemas estuarinos têm sofrido enorme devastação nas últimas décadas, devido, principalmente, ao desmatamento e obras de construção civil, resultantes do processo de urbanização; e aos resíduos da agricultura (LEE; YOUNGER, 2002), além dos impactos causados pela atividade da carcinicultura (ALONGI, 2002). Ainda nesse sentido, a poluição dos estuários associada à descarga de esgotos e resíduos animais tem se tornado um problema de grande preocupação em escala global (ALMEIDA; SOARES, 2012).

Dentre os organismos marinhos presentes nas áreas de estuários, os moluscos bivalves se destacam comercialmente, tanto pela sua extração em ambientes naturais, quanto pelo cultivo (BUITRAGO *et al.*, 2005). Levinton (2011) define os moluscos, principalmente os bivalves, como os organismos marinhos mais bem sucedidos na maricultura devido ao seu



rápido crescimento e à possibilidade de alocar os animais em áreas de altos índices de produção de fitoplâncton. Segundo a FAO (2012), ostras, berbigões, mexilhões e outros moluscos figuram entre as espécies comestíveis que não necessitam de alimentação artificial, caracterizando, assim, um avanço para o desenvolvimento da aquicultura, principalmente nos países pobres e em desenvolvimento.

### 3.2 Cultivo de ostra

Em meio aos diferentes organismos aquáticos explorados pela aquicultura, tem-se destacado a importância da utilização de recursos pesqueiros nativos, remetendo a uma atividade mais sustentável, com a diminuição da pressão sobre as populações naturais, além de contribuir para o aumento da produtividade nas áreas costeiras (LENZ, 2008). Nesse sentido, a ostreicultura vem sendo desenvolvida em comunidades litorâneas, gerando emprego e renda e incentivando a exploração racional dos recursos (PEREIRA *et al.*, 2000).

No Brasil, o cultivo de moluscos tem se desenvolvido apenas com algumas espécies de importância comercial, com destaque para a ostra do pacífico, *Crassostrea gigas* e o mexilhão *Perna perna* (RIBEIRO-COSTA; MARINONI, 2006), produzidos principalmente no Estado de Santa Catarina, Região Sul, que detém cerca de 90% da produção nacional de moluscos (SOUZA *et al.*, 2011).

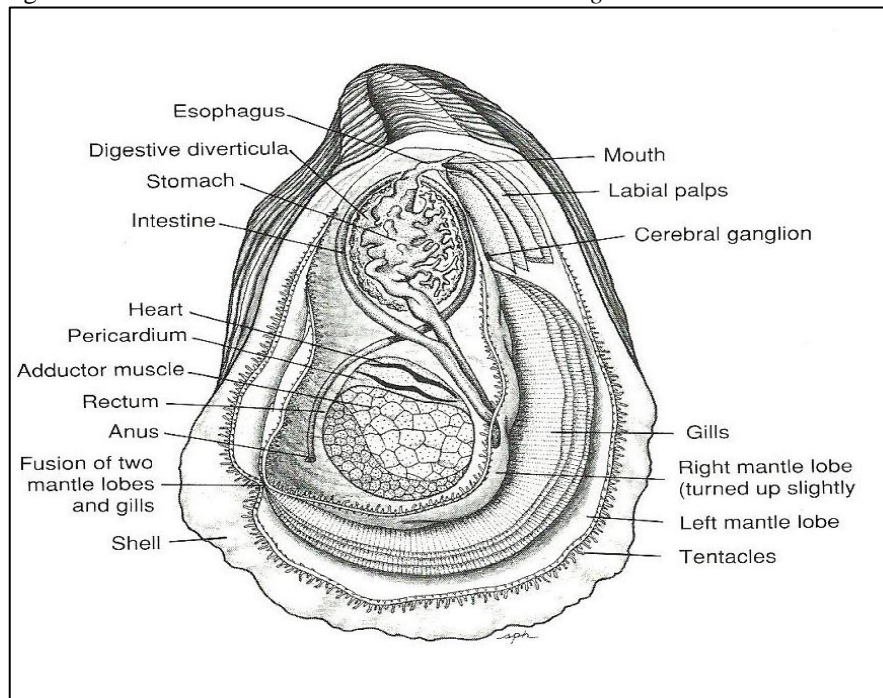
A ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, distribui-se desde o Uruguai até o Caribe, sendo encontrada, principalmente, em áreas de manguezal e estuários, fixando-se em rochas e substratos consolidados (RIOS, 1994); ou associada às raízes do mangue vermelho, ocupando a região entre marés (LODEIROS-SEIJO; FREITRES-VALBUENA, 2007). Esta espécie, extraída artesanalmente nos bancos naturais, passou a ser cultivada, em menor escala, em Estados das regiões Sudeste e Nordeste a partir da década de 1970 com cultivos experimentais instalados nos estados de São Paulo e da Bahia (POLI; LITTLEPAGE, 1998). As técnicas de cultivo da ostra do mangue ainda são incipientes no Brasil (MACCACHERO; GUZENSKI; FERREIRA, 2005), diferentemente de outros países do Caribe, como Cuba, que detém tecnologia de cultivo avançada e cuja produção do recurso atinge níveis relevantes (ESPINO; GUTIERREZ, 2010).

*Crassostrea rhizophorae* é uma espécie hermafrodita protândrica, ou seja, cujo sexo masculino é o primeiro a se manifestar (VILLARROEL; BUITRAGO; LODEIROS, 2004), atingindo o tamanho comercial a partir de 50 mm de altura (PEREIRA; HENRIQUES;

MACHADO, 2003). São moluscos eurialinos e euritérmicos, adaptados aos ambientes estuarinos (GALVÃO *et al.*, 2009).

O corpo da ostra, assim como dos bivalves em geral, possui simetria bilateral. O manto, que recobre a massa visceral, tem disposto em cada lateral uma brânquia, responsáveis pela filtragem do alimento e trocas gasosas. Seu sistema digestivo é formado pela boca, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus; a cavidade paleal constitui o espaço livre no interior das valvas, onde fica retida certa quantidade de água quando estas se fecham, chamada de líquido intervalvar (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005) (Figura 1).

Figura 1 – Anatomia da ostra americana *Crassostrea virginica*.



Fonte: Ruppert; Fox; Barnes (2005). Esophagus: esôfago. Digestive diverticula: divertículos digestivos. Stomach: estômago. Intestine: intestino. Heart: coração. Pericardium: pericárdio. Adductor muscle: músculo adutor. Rectum: reto. Anus: ânus. Fusion of two mantle lobes and gills: fusão dos dois lobos do manto e das brânquias. Shell: concha. Tentacles: tentáculos. Left mantle lobe: lobo esquerdo do manto. Right mantle lobe (turned up slightly): lobo direito do manto (ligeiramente virado). Gills: brânquias. Cerebral ganglion: gânglio cerebral. Labial palps: palpos labiais. Mouth: boca.

As ostras se alimentam através de partículas da água do mar, retidas pelas brânquias, sendo o fitoplâncton um dos principais itens alimentares, especialmente as diatomáceas (NOBRE, 1973). O mesmo autor também destaca que além das algas planctônicas, consomem substâncias orgânicas dissolvidas na água, que são retidas através de um muco produzido pelas brânquias e, então, levadas aos palpos labiais para sua nutrição.

São ainda excelentes filtradores, podendo acumular e reter micro-organismos, agindo, assim, como portadoras de agentes patogênicos ao homem (GOURMELON *et al.*, 2006). Dessa forma, uma das medidas para a implantação do cultivo de ostras é a escolha do local, que deve estar livre de poluição, uma vez que os estuários são atingidos diretamente por ações antrópicas (PROGRAMA BRASILEIRO DE INTERCÂMBIO EM MARICULTURA, 2003).

No Brasil, os parâmetros para águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves são definidos pela Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), estabelecendo que para águas salobras destinadas ao cultivo de moluscos bivalves com fins de alimentação humana, a quantificação de coliformes termotolerantes não pode exceder 43 NMP/100 mL, devendo este monitoramento ser realizado anualmente com um mínimo de cinco amostras (BRASIL, 2005).

Mais recentemente, foi criada a Instrução Normativa Interministerial (IN) nº7 de 8 de maio de 2012, que estabelece o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves no Brasil. Esta IN foi criada com base na necessidade de monitoramento de micro-organismos contaminantes e de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves, e do estabelecimento de requisitos de inspeção sanitária e industrial dos estabelecimentos de processamento dos moluscos bivalves como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, com a finalidade de garantir padrões mínimos de qualidade (BRASIL, 2012).

A legislação brasileira assemelha-se às normas estabelecidas por países desenvolvidos, como os Estados Unidos (NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM, 1997) e membros da União Europeia (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1991). Em contrapartida, a lei nacional foi publicada recentemente e ainda encontra-se em fase experimental, adiando ainda mais o cumprimento das normas necessárias para o cultivo e comercialização de moluscos de maneira segura.

### **3.3 Micro-organismos presentes em ostras**

A contaminação microbiana nos ambientes aquáticos por bactérias e outros micro-organismos é um crescente problema mundial, cuja origem primordial é a descarga de esgotos domésticos e industriais, principalmente em áreas costeiras (FU *et al.*, 2011). Segundo Fleming *et al.* (2006), os seres humanos são expostos a estas bactérias através do consumo de alimentos de origem marinha. Isso ocorre mais comumente nas comunidades onde o pescado

constitui a principal fonte de proteína; além da exposição à água do mar contaminada em praias e outras áreas de lazer.

Existem dois grupos de bactérias relevantes para a saúde pública que contaminam produtos marinhos: (1) bactérias endógenas ao ambiente marinho, tais como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*, bem como (2) *Listeria sp.* e enterobactérias, como *Salmonella sp* e *Escherichia coli* provenientes da contaminação de água com resíduos humanos (RIPPEY, 1994).

Inúmeros surtos de toxi-infecção alimentar causados pelo consumo de alimentos de origem marinha têm sido descritos na literatura, estando associados, em sua grande maioria, ao consumo de moluscos bivalves crus ou parcialmente cozidos, tornando-se um problema para a saúde pública (POTASMAN; PAZ; ODEH, 2002).

De Paola *et al.* (2000) e McLaughlin *et al.* (2005) relataram casos de surtos de gastroenterite nos EUA associados ao consumo de ostras *in natura* contaminadas por *V. parahaemolyticus*. Kirs *et al.* (2010) relataram ainda a alta ocorrência da mesma bactéria (95%) em ostras coletadas na Nova Zelândia, sendo observada, com menor frequência, a presença de *V. vulnificus* em 17% das amostras.

Ainda sobre os contaminantes endógenos, os membros do gênero *Aeromonas* encontram-se amplamente distribuídos nos ambientes aquáticos e são frequentemente isolados de diferentes alimentos marinhos, como peixes, moluscos e camarões (GRASSI; CIVERA; TURI, 2003; NEYTS *et al.*, 2000). Segundo Stratev, Vashin e Rusev (2012), esse gênero é considerado predominante em moluscos bivalves, especialmente ostras. Evangelista-Barreto *et al.* (2006) em pesquisa com ostras *C. rhizophorae*, reportaram a presença de *Aeromonas sp.* em 67% das amostras, incluindo as espécies *A. caviae* e *A. veronii*, reconhecidas atualmente como patógenos humanos.

Dentre os contaminantes exógenos, destacam-se os gêneros *Salmonella* e *Listeria*. A maioria dos casos de salmonelose tem sido causada pela ingestão de alimentos contaminados, provocando gastroenterite com diarreia, cólicas abdominais e febre (IWAMOTO, 2010). Segundo Olgunoglu (2012), surtos têm sido associados à ingestão de frutos do mar, como peixes, camarões, ostras e outros moluscos, incluindo uma variedade de alimentos sem um cozimento mínimo ou que são consumidos crus. Morrison *et al.* (2011), em pesquisa de *Salmonella* em ostras, sugerem que estas bactérias são capazes de permanecer a longo prazo nos tecidos do molusco, em um tipo de interação antes observada apenas para animais de maior porte.

De acordo com Embarek (1994), *Listeria sp.* tem sido isolada de alimentos marinhos provenientes de águas costeiras sujeitas à contaminação por fontes humana, industrial ou animal. Rodas-Suárez *et al.* (2006) e Chen *et al.* (2010) relataram a presença de *L. monocytogenes* em águas de estuários onde há extração de moluscos, mas não detectaram a bactéria em amostras do alimento, evidenciando a baixa contaminação de alimentos marinhos crus por este patógeno. Apesar da baixa incidência de listérias em ostras e outros produtos marinhos, a listeriose é uma doença que apresenta elevados índices de mortalidade, sendo patógeno oportunista em pessoas com sistema imunológico comprometido (AURELI *et al.*, 2003).

Muitos países que comercializam ostras desenvolveram um conjunto de normas próprias, baseadas em análises microbiológicas da água de seu cultivo e/ou da sua carne, como os países da União Europeia (UE), que monitoram as fontes de poluição microbiológica nas áreas de produção de moluscos, classificando-as posteriormente (CAMPOS *et al.*, 2012). A maioria desses padrões normativos está baseada na pesquisa de coliformes, pois esse grupo é considerado indicador de contaminação fecal (MACHADO *et al.*, 2001).

Os países membros da União Europeia determinam o nível de tratamento a ser aplicado antes da comercialização dos moluscos de acordo com a classificação das áreas de produção, através de legislação estabelecida pelos mesmos. A primeira categoria (A) inclui as áreas com moluscos contendo níveis inferiores a 230 *E. coli*/100g, destinados diretamente ao consumo humano. A categoria B engloba as áreas cujas contagens são maiores que 230 e inferiores a 4.600 *E. coli*/100g em 90% das amostras, e os moluscos devem passar pelo processo de depuração por pelo menos 48 horas antes de serem consumidas. A categoria C é representada pelas áreas cujas contagens foram superiores a 4.600 *E. coli*/100g e menores que 46.000 *E. coli* em 90% das amostras, e as ostras devem ser transferidas para áreas especiais por um período de dois meses antes da comercialização. A categoria D está representada pelas áreas cujas contagens de *E. coli*/100g foram superiores a 46.000, nesse caso fica proibida a comercialização de moluscos (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1991).

### **3.4 A importância de coliformes e *E. coli* como contaminantes**

Observa-se, nas legislações supracitadas, que o método mais utilizado para monitoramento da qualidade microbiológica em alimentos e águas de cultivo de moluscos é baseado na quantificação de coliformes fecais, assumindo que estas bactérias têm como

habitat natural o trato intestinal de animais de sangue quente, e, portanto, devem ter sido introduzidas para o sistema por meio de fontes externas (BRAWERE *et al.*, 2011; NEWELL *et al.*, 2010).

Dentre as bactérias do grupo coliformes, *Escherichia coli* é capaz de fornecer informações precisas sobre as condições higiênico-sanitárias tanto das ostras quanto da água de cultivo, já que a mesma é quase 100% de origem fecal, sendo o micro-organismo mais adequado para ser utilizado como indicador de contaminação fecal (EDBERG *et al.*, 2000; KAY *et al.*, 2004).

Os seis principais grupos de *E. coli* foram baseados em estudo dos fatores de virulência, manifestações clínicas produzidas, epidemiologia e sorotipagem, realizado por Nataro e Kaper (1998) e Meng, Feng e Doyle (2001). De acordo com os autores, os grupos reconhecidos como causadores de diarreia são: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC ou STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* Difusamente Agregada (DAEC). Ainda são citadas como patogênicas ao homem, as categorias: *E. coli* produtora de Shiga Toxina (STEC) ou Verotoxigênica (VTEC), *E. coli* Facultativamente Enteropatogênica (FEEC), *E. coli* Uropatogênica (UPEC) e *E. coli* Neonatal Meningite (NMEC) (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

*Escherichia coli* é um micro-organismo pertencente à família Enterobacteriaceae, e caracterizado como um importante componente do intestino tanto dos animais quanto do homem, fazendo parte da microbiota intestinal normal (GUARNER; MELAGELADA, 2003). São bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, que crescem bem em meio de cultura sintético contendo nutrientes simples e fermentam açúcares (TORRES, 2004).

Essas bactérias podem permanecer no organismo de forma inofensiva, mas em organismos fracos ou imunossuprimidos, até mesmo cepas não patogênicas podem causar infecções (PELCZAR; REID; CHAN, 1980-1981). *E. coli* pode causar uma variedade de doenças, incluindo diarreia, desintéria, síndrome hemolítica-urêmica e infecções renais (CUNIN *et al.*, 1999; KEENE *et al.*, 1994; SCHWARTZ *et al.*, 2011). Diferentes estirpes têm sido associadas a várias doenças, e essa versatilidade se deve à relativa facilidade que elas têm em adquirir os mais variados genes de virulência (ESTRADA-GARCÍA *et al.*, 2009).

Muitos autores têm reportado a contaminação de alimentos marinhos por enterobactérias, que são responsáveis por inúmeros surtos de gastroenterite após ingestão de

produtos marinhos contaminados. Van *et al.* (2008) e Ryu *et al.* (2012) relataram a contaminação de alimentos de diferentes origens (carne, galinha, moluscos e peixes) por *E. coli*, verificando ainda a presença de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos.

Diante dos frequentes casos de toxi-infecções alimentares, a recorrência de cepas bacterianas cada vez mais resistentes aos antimicrobianos tem se tornado um problema de interesse mundial (VAN *et al.*, 2008). Gow *et al.* (2008) destacam ainda que a bactéria *E. coli* é um micro-organismo com alta capacidade de troca de materiais genéticos, podendo facilmente transmitir ou adquirir estes genes de resistência.

### **3.5 Uso de antimicrobianos**

Os antimicrobianos podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias e fungos. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte do micro-organismo, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Atualmente são descritas várias classes de antimicrobianos, variando de acordo com a composição química e mecanismo de ação (GUIMARAES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os mesmos autores ainda descrevem algumas classes, com respectivos exemplos de antimicrobianos, como: penicilinas (penicilina e ampicilina), cefalosporinas (cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona), carbapenêmicos (imipinem), monobactâmicos (aztreonam), aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina), fluorquinolonas (ciprofloxacina), macrolídeos (eritromicina), tetraciclina (oxitetraciclina), fenicóis (cloranfenicol), quinolonas (ciprofloxacina), nitrofuranos (nitrofurantoína) e sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetropim ou sulfazotrim).

Sapkota *et al* (2008) relataram os antibióticos mais comumente utilizados pelos principais países produtores de pescado no mundo entre 1990 e 2007. A oxitetraciclina foi o mais utilizado, seguido por cloranfenicol e ácido nalidíxico.

#### **3.5.1 Mecanismos de resistência**

O mecanismo de resistência bacteriana pode ser considerado como uma resposta das bactérias frente às pressões seletivas geradas pelo uso extensivo de antimicrobianos e sua presença no meio ambiente (CABELLO, 2006). Este tem se tornado um problema emergente, uma vez que as bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações e são capazes de

realizar troca de material genético com estirpes da mesma espécie ou de espécies diferentes (WHITE; MCLVER; RAWLINSON, 2001).

A resistência a antimicrobianos em bactérias associadas à água e alimentos constitui um problema emergente em vários países (CONSTANZO; MURBY; BATES, 2005). Sabe-se que existe uma associação entre o uso de antimicrobiano e a ocorrência de resistência, uma vez que estes exercem uma pressão seletiva nos micro-organismos, assim, sua utilização constitui uma questão chave em estudos epidemiológicos (KUMMERER, 2004). A ameaça de doenças causadas por cepas de patógenos resistentes a antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos devido à transferência horizontal de genes de resistência de um tipo de bactéria para outra, e vários autores têm estudado os mecanismos de resistência a antimicrobianos em agentes patógenos, assim como bactérias associadas a alimentos (SCHWARTZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

Estudos em todo o mundo identificaram os ecossistemas aquáticos como possíveis reservatórios de resistência bacteriana a antimicrobianos (WANG *et al.*, 2008). A alta incidência de bactérias resistentes em resposta ao uso de antibióticos também foi relatada em áreas costeiras, sendo considerada como uma grave contaminação biótica e um meio para a propagação e evolução de genes de resistência e seus vetores (HERWIG; GRAY; WESTON, 1997).

Como resultado de condições pouco higiênicas e estressantes presentes nas instalações aquícolas, o risco de infecções bacterianas entre peixes cultivados é alto. Assim, uma quantidade expressiva de antimicrobianos está sendo utilizada na alimentação de peixes, com finalidade preventiva e profilática, em cultivos em todo o mundo (KEMPER, 2008; MARTINEZ, 2009). Este uso continuado de antimicrobianos na aquicultura tem resultado no aumento de estirpes resistentes a esses agentes (HENRIQUES *et al.* 2006). Dang *et al.* (2008) relatam a oxitetraciclina como uma droga largamente utilizada na medicina chinesa e que ainda continua sendo utilizada intensivamente como uma droga terapêutica na veterinária e maricultura.

### **3.5.2 Enzimas beta-lactamases**

As enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), produzidas por algumas estirpes de bactérias, têm a capacidade de quebrar a ligação amida do anel beta-lactâmico dos antibióticos, conferindo, assim, resistência às cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, como o aztreonam (AUGUSTI; SUPERTI; ZAVASCHI, 2007). Entretanto,



a ação destas enzimas é bloqueada na presença de inibidores de beta-lactamases, como o sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico, sendo este último utilizado com maior frequência (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

*Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* são reportadas como as espécies mais comumente relacionadas como produtoras de ESBL (NOGUEIRA *et al.*, 2006). As ESBL são codificadas por genes plasmidiais, e esta resistência pode ser facilmente transferida a diferentes espécies bacterianas por meio da conjugação (PEREZ *et al.*, 2007). Esta transferência pode se tornar ainda mais preocupante quando esses plasmídios possuem genes associados de resistência a outros antimicrobianos (BARBOSA *et al.*, 1999-2000).

Antes do advento das técnicas de biologia molecular, foram propostos pelo menos seis métodos para detecção de ESBL, entre eles podem ser citados: o uso de *breakpoints* modificados, teste de dupla difusão em disco, teste tridimensional e método de triagem com fitas (PFALLER; SEGRETI, 2006). Segundo Paterson e Bonomo (2005), nenhum desses métodos possui bom poder discriminatório. Os mesmos autores ainda ressaltam que os resultados podem ser subestimados, pois as cepas armazenadas podem perder os plasmídios que codificam tal resistência.

Além dos testes tradicionais, já tem sido realizados testes de biologia molecular, com a utilização de *primers* específicos para detecção das enzimas produtoras de beta lactamases (SANTOS *et al.*, 2008). As ESBL são codificadas por genes plasmidiais mutantes, especialmente TEM-1 e SHV-1 (BRAIOS, 2009), além do grupo CTM-X, recentemente descrito por Bonnet (2004). Meunier *et al.* (2006) relatam que os genes de resistência bacteriana podem ser transmitidos de alimentos de origem animal para os seres humanos.

A detecção de cepas produtoras de ESBL em isolados clínicos tem sido amplamente reportada em vários países, inclusive no Brasil, representando um problema para a saúde pública (CHAUDHURI *et al.*, 2011; CONEJO-JUÁREZ *et al.*, 2012; LUZZARRO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). No entanto, poucos estudos têm sido realizados para investigar a produção destas enzimas em cepas de origem ambiental (DUAN *et al.*, 2006; JOUINI *et al.*, 2007). Os mesmos autores ainda destacam a importância destas informações como forma de melhorar a compreensão quanto aos reservatórios potenciais desses genes.

### **3.6 Biofilmes**

Biofilmes são comunidades complexas de micro-organismos compostas por agregados de células bacterianas embebidas em uma matriz viscosa produzida por elas

mesmas e anexada a superfícies (JAIN; AGARWAL, 2009). As colônias microscópicas que compõem um biofilme podem ser compostas por bactérias de uma mesma espécie ou de espécies diferentes, dependendo das condições ambientais (COSTERTON; STEWART; GREENBARG, 1999).

O desenvolvimento de biofilmes em superfícies é um processo que envolve as etapas de adesão, crescimento, motilidade e produção de polissacarídeos extracelulares (HOIBY *et al.*, 2010). A natureza do biofilme e o estado fisiológico das bactérias nele inseridas conferem um alto nível de resistência aos antimicrobianos, aumentando o número de doenças associadas aos mesmos (APARNA; YADAV, 2008).

Os organismos que compõem os biofilmes são especializados e possuem complexidade estrutural e funcional (LAWRENCE *et al.*, 1991). Devido às pressões seletivas de certos ecossistemas, principalmente os ambientes aquáticos, esta se torna a melhor estratégia de crescimento adotada pelos micro-organismos (DONLAN, 2002).

Diferentes mecanismos de patogenicidade produzidos por biofilmes têm sido reportados na literatura, como (1) a capacidade de agregação a superfícies sólidas; (2) a “divisão de tarefas” que aumenta a eficiência do metabolismo da comunidade; (3) invasão de defesas do hospedeiro, como a fagocitose; (4) obtenção de alta densidade de micro-organismos; (5) troca de material genético que pode resultar em cepas mais resistentes; (6) produção de uma alta taxa de toxinas e (7) proteção contra os agentes antimicrobianos (LYNCH; ROBERTSON, 2008).

Atualmente existe uma enorme variedade de métodos fenotípicos para detecção da produção de biofilme, sendo mais utilizados os testes de aderência ao vidro (CHRISTENSEN *et al.*, 1982), ágar vermelho congo (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989), aderência a microplacas (CHRISTENSEN *et al.*, 1985), ensaios espectrofluorimétricos (BURTON; YAKANDAWALA; LO VETRI, 2007) e reações de PCR com genes específicos (CULLER, 2010).

Os micro-organismos comumente associados à produção de biofilme são compostos por bactérias Gram positivas e Gram negativas ou leveduras. As bactérias Gram positivas comumente isoladas de ambientes hospitalares são: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans*. Dentre as Gram negativas, destacam-se *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DONLAN, 2001).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias mais estudadas quanto à produção de biofilme, tendo sido muito utilizada como modelo para o conhecimento deste mecanismo

(COSTERTON *et al.*, 1994). Para *E. coli*, Sheik *et al.* (2001) associaram as estirpes enteroagregativas como produtoras regulares de biofilmes. A formação de biofilme também já foi reportada para estirpes de ETEC (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005) e EHEC (RYU; BEUCHAT, 2005)

Estas células formam agregados densos, sendo parcialmente protegidos da ação destruidora dos fagócitos (COSTERTON *et al.*, 1994). Segundo Liberto *et al.* (2009), microorganismos presentes em biofilmes são mais refratários a agentes antimicrobianos que organismos livres, pois as drogas podem não conseguir alcançar e produzir efeito nas bactérias retidas no interior do biofilme. Dessa forma, a capacidade de formar biofilmes sobre superfícies plásticas pode ser considerada como um fator de virulência (STEWART; COSTERTON, 2001), que compartilhado com mecanismos de resistência a antimicrobianos tornam as cepas ainda mais agressivas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Foram analisadas dez amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, comercializadas *in natura* em uma barraca da Praia do Futuro, região litorânea de Fortaleza-CE. As coletas foram realizadas no período de fevereiro a abril de 2012. Cada amostra foi constituída por doze ostras, perfazendo um total de 120 animais analisados. Os exemplares de ostras foram embalados em sacos plásticos, acondicionados em bolsa térmica e transportados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC), onde foram realizadas as análises microbiológicas. O tempo entre a coleta e o início das análises bacteriológicas não excedeu duas horas.

### 4.2 Preparação das amostras

As doze ostras de cada amostra foram lavadas vigorosamente em água corrente e abertas assepticamente para separação do fluido corporal (líquido intervalvar) e dos sítios anatômicos (músculo e trato gastrointestinal). Em seguida, foi feito um *pool* das doze ostras que compunham cada amostra.

#### 4.2.1 Fluido corporal - líquido intervalvar

Uma alíquota de 10 mL da amostra combinada de líquido intervalvar foi diluída em 90 mL de solução salina a 0,85% de NaCl e homogeneizada em agitador magnético (Coler Parmer) por 15 minutos. Este homogenato constituiu a diluição  $10^{-1}$ , a partir da qual foram feitas as diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ .

#### 4.2.2 Sítio Anatômico - músculo

De cada amostra foram pesados 25g do músculo, macerados e, em seguida, homogeneizados, em agitador magnético (Coler Parmer) por 15 minutos, em 225 mL de solução salina a 0,85% de NaCl. Esse homogenato constituiu a diluição decimal seriada de  $10^{-1}$ , a partir da qual foram preparadas as demais diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ , utilizando-se a proporção 1:9.

### 4.2.3 Sítio Anatômico - trato gastrointestinal

Foram macerados e pesados 5 g do *pool* do trato gastrointestinal e, em seguida, homogeneizados, em agitador magnético (Coler Parmer) por 15 minutos, em 45 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, constituindo a diluição  $10^{-1}$ . O procedimento foi repetido até a diluição  $10^{-5}$ .

## 4.3 Análises Bacteriológicas

### 4.3.1 Prova presuntiva

De cada diluição em solução salina, retirou-se uma alíquota de 1 mL para ser transferida a um tubo contendo 10 mL de Caldo Lauril Triptose (Difco) com tubos de Durhan invertidos. Este procedimento foi feito em cinco repetições para cada diluição. Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas, considerando-se positivos para a prova presuntiva de coliformes totais aqueles que apresentaram turvação e produção de gás após esse período.

### 4.3.2 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

De cada tubo positivo para coliformes termotolerantes, retirou-se uma alíquota que foi estriada em placa de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Difco) para incubação a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram isoladas de três a cinco colônias, de cada diluição, com brilho verde metálico e/ou centro negro, características consideradas típicas de *E.coli*. Nas coletas em que não houve crescimento típico foram isoladas colônias atípicas. Estas colônias foram inoculadas, separadamente, em tubos de Ágar Triptona Soja (TSA) (Difco), incubados a 35°C por 24 horas.

Do crescimento ocorrido no meio TSA foi realizada a identificação fenotípica de *E. coli* de acordo com esquema de Feng, Weagant e Grant (2002), que recomendam as provas bioquímicas de produção de indol, Voges-Proskauer, vermelho de metila e citrato, conhecido como IMViC. As cepas que apresentarem resultados no teste para o biótipo 1 (+ + - -) ou para o biótipo 2 (- + - -) foram consideradas *E. coli*.

#### 4.3.2.1 Produção de Indol e de H<sub>2</sub>S

Todas as cepas foram inoculadas com agulha de platina em tubos contendo Ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (Difco) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionadas ao meio cinco gotas do reagente de Erlich. A positividade do teste foi evidenciada pela formação de um halo rósea. O resultado negativo foi caracterizado pela formação de um halo amarelo. Ainda no meio de cultivo SIM foi determinada a prova de produção de H<sub>2</sub>S com positividade evidenciada pelo escurecimento do meio.

#### 4.3.2.2 Vermelho de Metila (VM)

As cepas foram inoculadas em tubos contendo caldo MR-VP (Difco) e incubadas a 35°C por 96 horas. Após esse período, foram adicionadas ao meio cinco gotas do reagente vermelho de metila. A mudança de coloração do meio para vermelho indicou a positividade do teste. Em caso negativo, a coloração do meio continuou amarela.

#### 4.3.2.3 Voges-Proskauer (VP)

Todas as cepas em identificação foram inoculadas em tubos contendo caldo MR-VP (Difco) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados, para cada mililitro do meio, 0,6 mL do reativo Barrit I ( $\alpha$ -naftol a 5%) e 0,2 mL do reativo Barrit II (KOH a 40%). Após agitação vigorosa, os tubos foram deixados em repouso por duas horas. A coloração vermelha na superfície do meio indicava positividade da prova.

#### 4.3.2.4 Citrato

Uma alçada de cada cepa foi inoculada em tubos contendo Ágar Citrato de Simmons (Difco) com incubação a 35°C por 96 horas. A positividade do teste foi indicada pela mudança de coloração do meio de verde para azul.

### 4.3.3 Quantificação de coliformes termotolerantes e *E. coli*

A quantificação de coliformes termotolerantes foi feita pelo método do Número Mais Provável (NMP) conforme as recomendações de Blodgett (2006). Dos tubos que apresentaram positividade na prova presuntiva, transferiu-se uma alçada para tubos contendo 4 mL de Caldo EC (Difco) com tubos de Durham invertidos, que foram incubados em banho-maria a 45°C por 48 horas. Os tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram considerados positivos para coliformes termotolerantes a 45°C.

Para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes selecionou-se uma série crítica das cinco repetições, com posterior consulta à tabela do Bacteriological Analytical Manual (BAM) (BLODGETT, 2006). O valor encontrado na tabela foi multiplicado pelo inverso do valor da diluição média dos tubos selecionados para a série. Para o líquido intervalvar o resultado foi dado em NMP/mL e para o músculo e trato gastrointestinal em NMP/g. Calculou-se, ainda, o NMP total de cada coleta, referente à soma dos valores do fluido corporal e de cada sítio anatômico. Nas diluições onde se obteve uma estimativa da quantificação ( $<1,8$ ), considerou-se, para fins de cálculo da quantificação total e média, o valor de 1,7.

Para fins de comparação com as atuais legislações, foi calculado o NMP de coliformes termotolerantes por 100 g, apenas multiplicando o valor do NMP total de cada coleta por cem. Para o cálculo do NMP de *E. coli*, foram considerados somente os tubos do caldo EC de onde foi confirmada a bactéria pelo IMViC, estabelecendo-se uma série crítica à repetição do cálculo do NMP de coliformes termotolerantes total de cada coleta. O resultado foi dado em NMP de *E. coli*/100 g.

### 4.3.4 Antibiograma

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada a partir da técnica de difusão em discos (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 2005) para as cepas confirmadas como *E. coli*. Primeiramente, as cepas foram cultivadas em Ágar Triptona Soja (TSA) e incubadas a 35°C/24h. Para o ajuste da concentração bacteriana, as cepas crescidas em TSA foram diluídas em solução salina a 0,85% e comparadas com o padrão de turbidez de McFarland 0,5. A comparação foi feita a partir da medida de densidade ótica (DO) em espectrofotômetro (Micronal B542) em comprimento de onda de 625 nm, considerando que a solução padrão possuía absorvância de 0,100. A turbidez comparável à solução padrão é

equivalente a uma suspensão de aproximadamente  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)  $\text{ml}^{-1}$ .

Em seguida, os inóculos previamente ajustados foram semeados com *swab* sobre superfície do meio Ágar Muller-Hinton (Difco) em placas para posterior aplicação dos discos de antimicrobianos da marca LABOCLIN, com exceção dos discos de Oxitetraciclina (OTC 30  $\mu\text{g}$ ) que foram preparados em laboratório. Para cada cepa foram testados 19 antimicrobianos (de uso clínico e veterinário) pertencentes às classes Aminoglicosídeos (Gentamicina GEN 10  $\mu\text{g}$ , Amicacina AMI 30  $\mu\text{g}$  e Neomicina NEO 30  $\mu\text{g}$ ), Penicilinas (Ampicilina AMP 10  $\mu\text{g}$  e Amoxicilina AMO 10  $\mu\text{g}$ ), Carbapenêmicos (Imipinem IPM 10  $\mu\text{g}$ ), Cefalosporinas (Cefalotina CFL 30  $\mu\text{g}$ , Cefoxitina CFO 30  $\mu\text{g}$  e Ceftriaxona CRO 30  $\mu\text{g}$ ), Fenicolis (Cloranfenicol CLO 30  $\mu\text{g}$ ), Quinolonas (Ácido Nalidíxico NAL 30  $\mu\text{g}$ , Ciprofloxacina CIP 5  $\mu\text{g}$  e Norfloxacina NOR 10  $\mu\text{g}$ ), Tetraciclina (Tetraciclina TET 30  $\mu\text{g}$  e Oxitetraciclina OTC 30  $\mu\text{g}$ ), Sulfonamidas (Sulfazotrim SUT 25  $\mu\text{g}$ ), Nitrofuranos (Nitrofurantoína NIT 300  $\mu\text{g}$ ) e Penicilinas com inibidores de  $\beta$ -lactamase (Amoxicilina-Ácido clavulânico AMC 30  $\mu\text{g}$  e Ampicilina-Sulbactam ASB 20  $\mu\text{g}$ ).

Após o período de incubação (35°C/24 horas), procedeu-se à medição dos halos com paquímetro digital (Digimess) e o comportamento de cada cepa foi classificado como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com recomendações do CLSI (2011). O padrão de interpretação dos tamanhos dos halos, para cada antimicrobiano testado, encontra-se detalhado na tabela 1.



Tabela 1 – Padrões para interpretação dos halos (mm) de inibição do antibiograma pelo teste de difusão em disco.

Antimicrobiano	Classificação		
	S	I	R
Ácido Nalidíxico	≥ 19	14-18	≤ 13
Amicacina	≥ 17	15-16	≤ 14
Amoxicilina	≥ 17	14-16	≤ 13
Amoxicilina-Ácido clavulânico	≥ 18	14-17	≤ 13
Ampicilina	≥ 17	14-16	≤ 13
Ampicilina-Sulbactam	≥ 15	12-14	≤ 11
Cefalotina	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefoxitina	≥ 18	15-17	≤ 14
Ceftriaxona	≥ 21	14-20	≤ 13
Ciprofloxacina	≥ 21	16-20	≤ 15
Cloranfenicol	≥ 18	13-17	≤ 12
Gentamicina	≥ 15	13-14	≤ 12
Imipinem	≥ 16	14-15	≤ 13
Neomicina	≥ 17	13-16	≤ 12
Nitrofurantoína	≥ 17	15-16	≤ 14
Norfloxacina	≥ 17	13-16	≤ 12
Sulfazotrim	≥ 16	11-15	≤ 10
Tetraciclina	≥ 15	12-14	≤ 11
Oxitetraciclina	≥ 15	12-14	≤ 11

\*S: Sensível. I: Intermediário. R: Resistente.

Fonte: CLSI (2011)

#### 4.3.4.1 Cura plasmidial

As cepas que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano foram selecionadas e submetidas à técnica de “cura” dos plasmídios pelo agente curagênico *acridine orange* (SIGMA A-6014) (MOLINA-AJA *et al.*, 2002), a fim de se classificar a natureza da resistência como potencialmente cromossômica ou plasmidial.

Para realização do teste, as estirpes foram cultivadas em caldo Luria Bertani (Difco) suplementado com 0,100 mg/mL de *acridine orange*, com incubação a 35°C por 24 horas. Após este período, foram retirados inóculos e semeados em TSA seguido de nova incubação a 35°C/24h. A partir do crescimento em TSA, foi realizado antibiograma como descrito no item supracitado. A resistência foi considerada potencialmente cromossômica quando observada após a cura do plasmídio, em caso contrário, foi caracterizada como plasmidial.

#### 4.3.4.2 Cálculo dos índices MAR e ARI

O índice de multirresistência a antimicrobianos (MAR) foi calculado para as cepas que apresentaram resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos, pela fórmula  $a/b$ , onde  $a$  é o número de antimicrobianos de classes diferentes que a cepa se mostrou resistente e  $b$  o número de classes de antimicrobianos testados. O índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

O Índice de Resistência a Antimicrobianos (ARI) foi calculado segundo metodologia proposta por Jones *et al.* (1986), através da fórmula  $y/nx$ , onde  $y$  é o número total de resistentes,  $n$  é o número de isolados e  $x$  é o número de antimicrobianos testados. Foi também calculado o ARI por estrato de cada amostra: líquido, músculo e trato gastrointestinal, utilizando-se a mesma fórmula citada com substituição do  $n$  pelo número de isolados de cada estrato.

#### 4.3.4.3 Subpopulações

As cepas de *E. coli* isoladas como possíveis subpopulações foram submetidas novamente ao teste de antibiograma, apenas para o antimicrobiano em questão, para confirmação nesta categoria. As cepas das subpopulações foram, então, classificadas como intermediárias ou resistentes e, quando confirmado o perfil de resistência, estas cepas foram submetidas à técnica de “cura” seguindo a metodologia citada anteriormente (4.3.4.1).

#### 4.3.4.4 Produção de ESBL

Para detecção da produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), procedeu-se a adaptações da metodologia de Braios (2009). Foram selecionadas as cepas de *E. coli* que se apresentaram resistentes às penicilinas (ampicilina e amoxicilina), para serem testadas frente aos antimicrobianos com inibidores de beta-lactamase, através de dois testes.

O primeiro teste consistiu em adicionar a placas com o meio Ágar Muller Hinton, semeado com a suspensão bacteriana, um disco contendo o antimicrobiano composto e um disco de penicilina. Em placas separadas, foi adicionado um disco de amoxicilina-ácido clavulânico e um disco de amoxicilina e na outra placa um disco de ampicilina-sulbactam e um disco de ampicilina. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação,

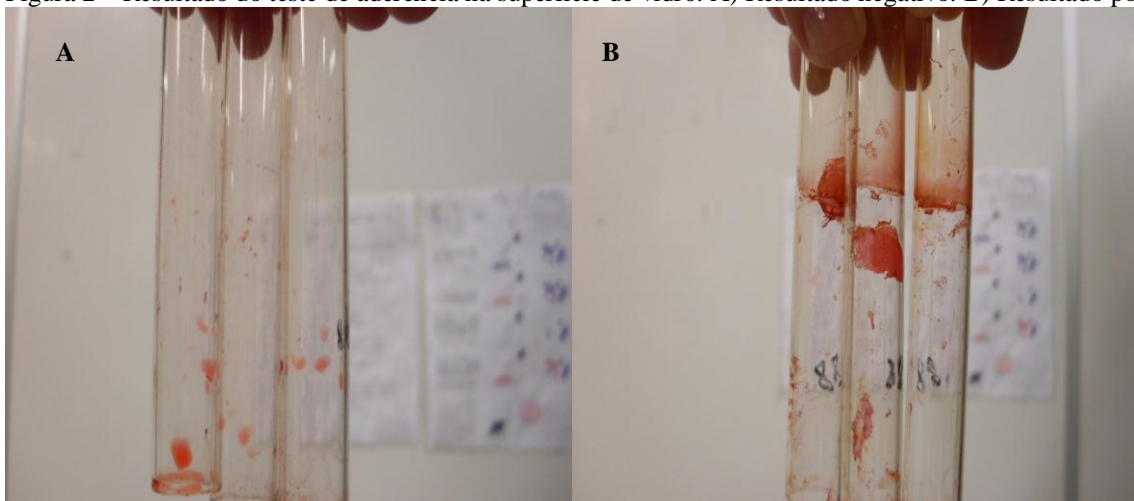
procedeu-se à leitura dos halos. O aumento no halo de inibição de 5 mm ou mais dos discos contendo o antimicrobiano composto em relação ao disco de penicilina, foi considerado indicativo para produção de ESBL.

O segundo teste consistiu em adicionar a placas com o meio Ágar Muller Hinton semeado com a suspensão bacteriana, um disco de antimicrobiano composto no centro da placa e o disco da penicilina correspondente distante 25 mm. As placas foram incubadas a 35°C por 18 horas. Após esse período, observou-se o surgimento de um halo de inibição adicional (*ghost-zone*) entre o disco contendo o antimicrobiano composto e o disco de penicilina. A presença deste halo de inibição foi considerada positiva para produção de ESBL.

#### 4.3.5 Teste de agregação

Para detecção da produção de biofilme foram selecionadas cepas de *E. coli* multirresistentes no teste do antibiograma para realização do teste de aderência na superfície de vidro, segundo metodologia proposta por Kaiser (2010). As cepas foram cultivadas, em triplicata, em tubos contendo 3 mL de Caldo Triptona Soja (TSB) (Difco) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período, o conteúdo dos tubos foi descartado e sua superfície interna lavada duas vezes com água destilada, adicionando-se, então, 3 mL de solução de safranina a 0,1% por 1 minuto. Em seguida, o corante foi descartado e os tubos invertidos para secagem e leitura. Foi considerado como resultado positivo a formação de um biofilme na parede do tubo (Figura 2).

Figura 2 – Resultado do teste de aderência na superfície de vidro. A) Resultado negativo. B) Resultado positivo.



#### **4.4 Análises estatísticas**

Os dados relativos à quantidade de coliformes termotolerantes (tratamentos), representada pelas unidades NMP/mL, para o líquido intervalvar e NMP/g para o músculo e trato gastrointestinal da ostra do mangue, foram submetidos ao teste da Análise de Variância (ANOVA), em blocos casualizados. O objetivo da análise estatística foi avaliar se os valores do NMP/g apresentaram diferenças suficientemente elevadas para se atribuir significância ao processo de contaminação do músculo e do trato gastrointestinal por coliformes. O líquido intervalvar foi excluído dessa comparação pelo fato de seu NMP ter sido estimado em uma unidade (mililitro) diferente daquela utilizada para os outros dois tratamentos (grama).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (Ct) a 45°C e *E. coli* nas amostras de ostra *in natura* estão apresentados na tabela 2. As contagens de Ct de cada coleta variaram de 5,4 a 1.410 NMP/g, enquanto que para o líquido intervalvar variou de < 1,8 a 1.100 NMP/mL, para o músculo de < 1,8 a 180 NMP/g e de < 1,8 a 130 NMP/g para o trato gastrointestinal.

Tabela 2 – Quantificação de coliformes termotolerantes a 45°C (NMP/g ou mL e NMP/100 g) e *E. coli* (NMP/100 g) para amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.

Amostra	Ct/mL	Ct/g	Ct/g	Ct/g	Ct/100 g	<i>E. coli</i> /100 g
	Líquido	Músculo	TG	Total		
A1	17	7,8	22	46,8	4.680	1.300
A2	170	79	23	272	27.200	17.600
A3	13	4,5	<1,8	19,2	1.920	1.300
A4	<1,8	<1,8	2	5,4	540	<1,8
A5	2	<1,8	<1,8	5,4	540	<1,8
A6	1.100	180	130	1.410	141.000	123.000
A7	130	2	4,5	136,5	13.650	13.650
A8	11	<1,8	13	25,7	2.570	1.300
A9	4,5	4,5	2	11	1.100	450
A10	2	4,5	4,5	11	1.100	1.100
<b>Média</b>	<b>145,12</b>	<b>28,74</b>	<b>20,44</b>	<b>194,3</b>	<b>19.430</b>	<b>15.970</b>
<b>DP</b>	<b>340,88</b>	<b>58,23</b>	<b>39,38</b>	<b>435,47</b>	-	-

\*TG: trato gastrointestinal. DP: desvio padrão. Ct: coliformes termotolerantes.

A legislação vigente, RDC nº 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001), no item vinte e dois (22) alínea “b”, para produtos à base de carnes, pescado e similares crus, estabelece limite  $10^2$  NMP/g para coliformes a 45°C. Apenas três amostras (A2, A6 e A7) apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos por esta determinação, sendo que estas contagens foram suficientemente elevadas para tornar a média das dez amostras inaceitável para coliformes a 45°C.

Entretanto, Morelli (2003) pesquisando coliformes termotolerantes em ostras comercializadas na mesma área encontrou valores mais elevados do que os obtidos na presente pesquisa, com variação de < 3,0 a 110.000 NMP/g. Apesar dos índices elevados, apenas 40% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela RDC.

Muñoz *et al.* (2008) também reportaram quantificações elevadas de Ct em mexilhões, extraídos de bancos naturais da Venezuela, com oscilação entre zero e 11.000 NMP/g. Estes autores relataram uma maior diversidade de enterobactérias nos moluscos em comparação com a água e relacionaram este aumento à capacidade concentradora destes

organismos ao filtrar partículas em suspensão via bombeamento da água. Dessa forma, ocorre um intercâmbio entre a massa de água, os sedimentos carregados de matéria orgânica e os micro-organismos, fazendo com que os moluscos revelem a condição bacteriológica da água onde se encontram.

Em pesquisa sobre coliformes fecais em ostras *C. rhizophorae* oriundas de bancos naturais da Venezuela, González *et al.* (2011) relataram contagens superiores às do presente estudo, com média de 12.300 NMP/g. Feldhusen (2000) ressalta que o índice de bactérias patogênicas em produtos marinhos frescos é usualmente baixo, mas que o tratamento dos mesmos mediante cocção nem sempre assegura sua inocuidade.

Por outro lado, resultados semelhantes ao nosso estudo foram relatados por Silva *et al.* (2003), quando pesquisaram a presença de coliformes termotolerantes em ostras *C. rhizophorae* no Estuário do Rio Cocó, Ceará, encontrando níveis de 1,8 a 920 NMP/g; e estudo realizado por Pereira *et al.* (2006) que pesquisaram coliformes a 45°C em ostras *C. gigas* comercializadas em Florianópolis, encontrando contagens entre 3 e 1.000 NMP/g.

Observa-se ainda, segundo a tabela 2, uma quantificação de coliformes termotolerantes a 45°C mais elevada para o líquido intervalvar, em seis das dez amostras realizadas, evidenciada pela média do fluido que foi de 145,12 Ct/mL, enquanto que o músculo e o trato gastrointestinal apresentaram contagens bem inferiores, com média de 28,74 e 20,44 Ct/g, respectivamente.

A ocorrência destacada de coliformes termotolerantes no líquido intervalvar das ostras comercializadas pode ser explicada por sua maior proximidade com o meio externo, se comparado aos outros estratos, além de que este fluido proporciona condições mais favoráveis ao crescimento microbiano que o músculo, sendo geralmente composto de proteínas, glicoproteínas, carboidratos e aminoácidos, apresentado variação de pH entre 7,0 e 8,5 (SILVA, 2007). Segundo Allan e Paillard (1998), o líquido intervalvar possui apenas a função de secretar a concha, sendo a função imunológica exercida pela hemolinfa, que é um fluido interno, tornando, assim, este fluido corporal mais vulnerável ao ataque microbiano.

Pode-se ressaltar também que as ostras comercializadas na Praia do Futuro são trazidas de uma região próxima à cidade de Parnaíba, Estado do Piauí, a cerca de 500 km de Fortaleza, podendo ser estocadas por períodos prolongados até a sua comercialização, quando não se alimentam, e acabam por eliminar seus dejetos na cavidade paleal, diminuindo, assim, as contagens no trato gastrointestinal.

De acordo com Kueh (1987), a colonização de bactérias entéricas em moluscos bivalves é um processo dinâmico e está relacionado com alguns fatores, como o tipo e a

concentração destas no ambiente aquático, a taxa e eficiência de filtração das ostras, capacidade do animal em eliminá-las pelo intestino e possibilidade de multiplicação ou destruição de células bacterianas nos tecidos dos bivalves. O mesmo autor ainda relata uma baixa taxa de depuração em ostras *Crassostrea gigas*, sugerindo que estes moluscos retêm células de *E. coli* dentro dos seus tecidos e rapidamente as eliminam nas fezes.

Além disso, muitos estudos conduzidos à base de experiências de incorporação de culturas bacterianas em ostras demonstram que essas células são rapidamente assimiladas, mas não são incorporadas na microbiota, sendo eliminadas. Este fato pode ser explicado por uma competição entre as bactérias naturalmente presentes no trato gastrointestinal destes animais e as bactérias oriundas do ambiente externo (FROELICH; OLIVER, 2013).

Tais assertivas corroboram com os resultados do presente estudo, uma vez que são capazes de explicar as baixas contagens observadas no músculo e no trato gastrointestinal, em oposição às elevadas contagens do líquido intervalvar que recebe as excretas do animal, por onde são eliminadas as bactérias exógenas. Estes mesmos autores ressaltam ainda que os moluscos bivalves são capazes de acumular essas bactérias de ambientes contaminados e, uma vez colocadas em ambientes de depuração, conseguem eliminá-las com a mesma rapidez, o que revela a importância deste processo como forma de evitar as gastroenterites causadas pelo consumo do alimento, principalmente quando consumido cru.

Os resultados relativos à comparação entre músculo e trato gastrointestinal se encontram na tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da Análise de Variância aplicada aos valores de NMP/g de coliformes termotolerantes identificadas no músculo e trato gastrointestinal de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.

<b>Fonte de variação</b>	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Valor-p</b>	<b>F<sub>crítico</sub></b>
<b>Varição total</b>	19	43,6770	---		---	---
<b>MS x TG</b>	1	0,0246	0,0246	0,0101	0,9209	4,4139
<b>Resíduo</b>	18	43,6524	2,4251		---	---

\*gl: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: variâncias. MS: músculo. TG: trato gastrointestinal.

Os dados da tabela 3 mostram que a contaminação da ostra-do-mangue por coliformes termotolerantes atinge igualmente o músculo e o trato gastrointestinal, já que o valor de F (0,0101) não é estatisticamente significativo ( $p = 0,9209$ ) para 1 grau de liberdade (gl) entre tratamentos (QM = 0,0246) e 18 graus de liberdade do resíduo de variância (QM = 2,4251).

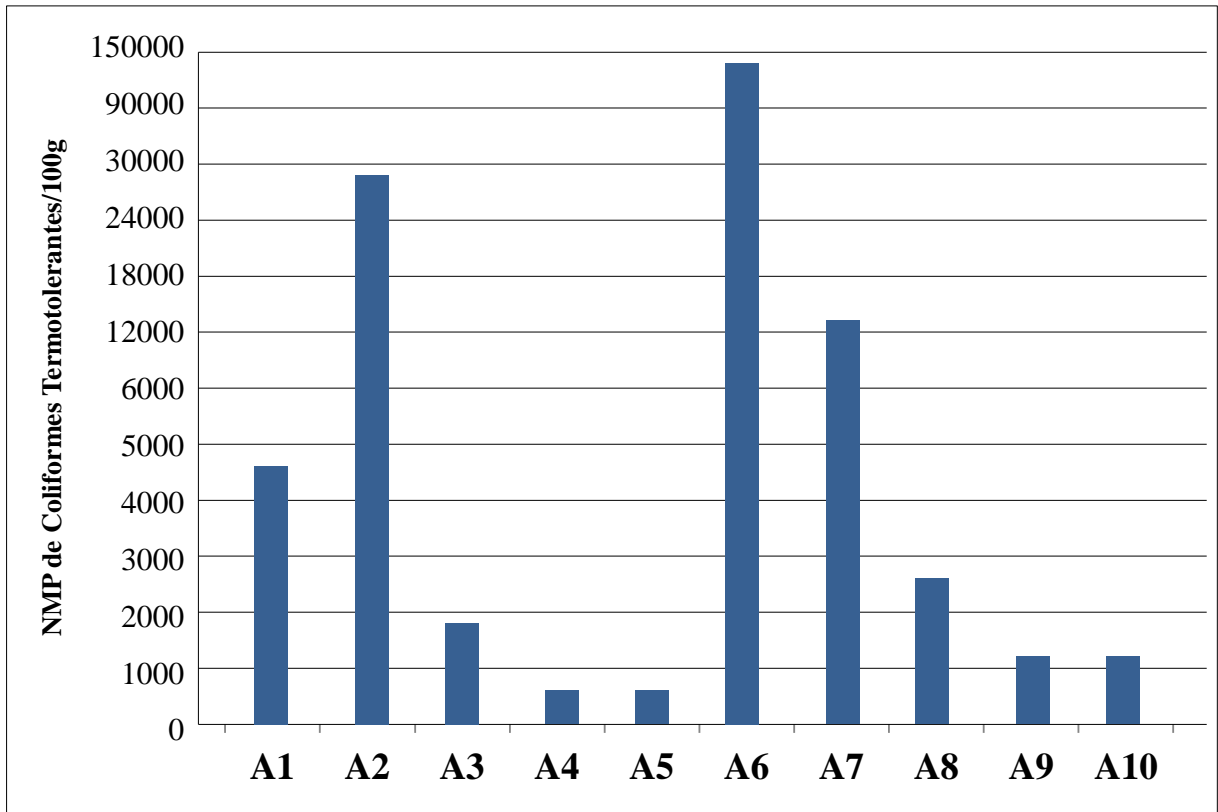
A tabela 2 expressa também as contagens de coliformes termotolerantes e *E. coli* em NMP/100 g, visto que esta unidade é abordada pelas legislações do Brasil e de outros países para classificação das áreas de extração e cultivo de moluscos.

A legislação estabelecida para os países da Comunidade Europeia baseia-se também na contagem de coliformes termotolerantes para classificação das áreas de extração de moluscos (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1991). Esta determina que as ostras com contagens até 300 Ct/100 g podem ser encaminhadas diretamente ao consumo humano, sendo classificadas na categoria A. Entretanto, aquelas com contagens até 6.000 Ct/100 g devem ser submetidas ao processo de depuração antes da comercialização por, no mínimo 48 horas, sendo classificadas na categoria B; a categoria C engloba as ostras com contagens entre 6.000 e 60.000 Ct/100 g, que devem passar por processo de depuração por dois meses; amostras com contagens superiores a 60.000 Ct/100 g, não podem ser comercializadas, enquadrando-se na categoria D

De acordo com estas normas, nenhuma das amostras de ostras da presente pesquisa poderiam se enquadrar na categoria A, ou seja, estas teriam que ser depuradas por dois dias, no mínimo, antes de serem encaminhadas ao consumo. As ostras oriundas de sete amostras (A1, A3, A4, A5, A8, A9 e A10) seriam classificadas na categoria B, necessitando de depuração por 48 horas. As amostras A2 e A7 seriam classificadas na categoria C, com tratamento adicional por dois meses antes da comercialização. Enquanto que, as ostras da amostra A6, com contagem superior a 60.000 Ct/100 g, seriam enquadradas na categoria D, não podendo ser comercializadas (Gráfico 1).



Gráfico 1 – Contagens de coliformes termotolerantes expressas em NMP/100 g para as dez coletas de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.



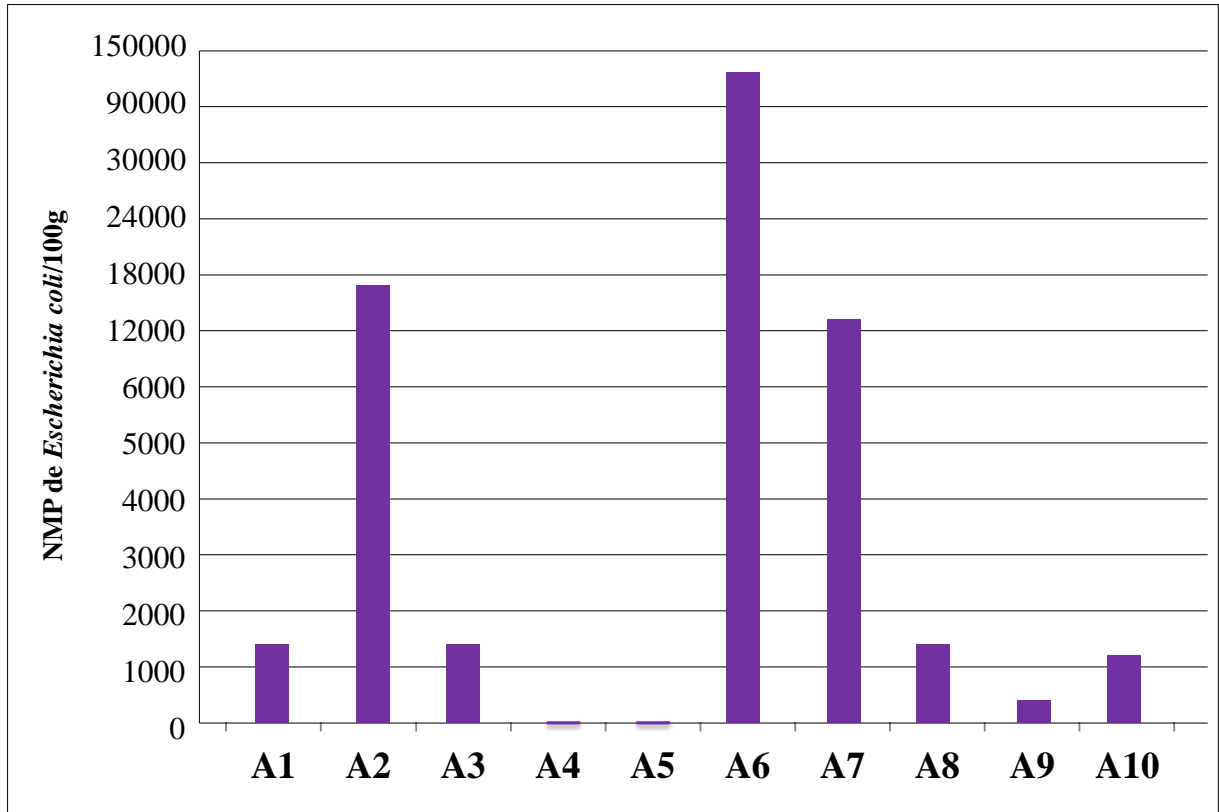
Segundo Vieira (2004), a depuração é o processo pelo qual os moluscos são acondicionados em tanques de água limpa e corrente com a finalidade de redução da sua carga bacteriana aos níveis aceitáveis para o consumo humano. No Brasil, especialmente no Nordeste, a prática de depuração ainda não é disseminada, elevando os riscos de contaminação para os consumidores deste produto.

A recente Instrução Normativa criada pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012) estabelece que a retirada dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano seja definida como: I – liberada: para aquelas amostras com contagens inferiores a 230 *E.coli*/100 g; II – liberada sob condição: para amostras com contagens de *E. coli* entre 230 e 46.000 NMP/100 g; e III – suspensa: para amostras apresentando acima de 46.000 *E.coli*/100 g. Ainda segundo a norma, os moluscos procedentes da área II só podem ser colocados no mercado após depuração.

Como expresso na tabela 2, a quantificação de *E. coli* para as amostras de ostras comercializadas variaram de 1,8 a 123.000 NMP/100 g. Levando-se em consideração a utilização deste parâmetro, apenas duas coletas (A4 e A5) estariam classificadas no ponto I e estariam liberadas, por outro lado as coletas A1, A2, A3, A7, A8, A9 e A10 (70% da

amostragem) teriam que passar por processo de depuração antes da liberação, enquanto que as ostras da coleta A6 teriam retirada suspensa (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Contagens de *E.coli* expressas em NMP/100 g para as dez coletas de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.



Dessa forma, pode-se considerar o parâmetro estabelecido pela legislação europeia, com contagens de coliformes termotolerantes, o mais restritivo para as quantificações observadas no presente estudo, já que, para este, 90% das amostras de ostras teriam que passar por processo de depuração, conseqüentemente nenhuma estaria liberada diretamente para o consumo humano.

O perfil de origem das cepas isoladas das amostras de ostras, bem como seu perfil de identificação, encontram-se descritos na tabela 4. Foram isoladas 222 cepas das placas de EMB, das quais 109 (49%) oriundas do líquido intervalvar, 61 (27%) do trato gastrointestinal e 52 (24%) do músculo. Da totalidade das cepas isoladas, 137 (62%) foram identificadas e confirmadas como *E. coli* pelo IMViC e as demais classificadas como outras enterobactérias. Dentre as dez coletas realizadas, oito apresentaram positividade para o isolamento da espécie, sendo que 69% dos isolados do líquido intervalvar foram confirmados como *E. coli*,

apresentando maior índice de isolamento quando comparado ao músculo (54%) e trato gastrointestinal (55%).

Tabela 4 – Perfil de isolamento e identificação das enterobactérias oriundas das amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.

Origem	Isoladas	<i>E.coli</i>		Outras enterobactérias	
		n	%	n	%
Músculo	52	28	20,4	24	28,2
Líquido	109	75	54,7	34	40,0
Trato gastr.	61	34	24,9	27	31,8
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>137</b>	<b>62</b>	<b>85</b>	<b>38</b>

n: número de cepas.

A partir dos elevados percentuais de *E. coli* encontrados nas ostras comercializadas, confirma-se sua baixa qualidade microbiológica, possivelmente relacionada ao elevado nível de contaminação por coliformes termotolerantes dos ambientes aquáticos onde estes moluscos são capturados. A presença de membros da família Enterobacteriaceae deve servir como advertência, já que estas bactérias estão associadas com a incidência de infecções na população humana, constituindo um risco para a saúde pública.

Papadopolou *et al.* (2007) sugerem que o alto índice de isolamento de *E. coli* esteja associado ao contato direto das ostras analisadas com corpos de água detentores de uma importante microbiota alóctone oriunda de águas residuais ou de escoamento. Além disso, a presença de coliformes termotolerantes pode estar relacionada com a manipulação inadequada do produto, que pode ocorrer durante as etapas de transporte, beneficiamento ou comercialização (RIPPEY, 1994).

A realização de procedimentos inadequados após a colheita dos moluscos pode contribuir para a multiplicação de micro-organismos no alimento. Na barraca de praia onde foram realizadas as coletas, observou-se que as ostras foram transportadas do Estado do Piauí para Fortaleza, sem higienização prévia e à temperatura ambiente. Na barraca responsável pela distribuição do molusco para outros estabelecimentos da Praia do Futuro e de Fortaleza, as ostras eram mantidas sob as mesmas condições até a comercialização. Segundo Jay (2005), temperaturas a 25°C dão melhores condições para multiplicação bacteriana em alimentos. Dessa forma, o estocamento inadequado das ostras durante o período entre a coleta e a venda também pode ter contribuído para as elevadas contagens.

A presença de coliformes termotolerantes e *E. coli* nos locais de comercialização de moluscos supõe a existência de interferências ambientais na microbiologia das águas de captação. Este fato indica a necessidade de monitoramento da qualidade das águas de cultivo

e extração, incluindo ainda a implantação de programas de boas práticas de manipulação e fiscalização dos estabelecimentos. Segundo Pereira *et al.* (2000), a garantia de qualidade de moluscos extraídos ou cultivados é dada pela correta manipulação ou pela depuração do produto.

Outro resultado obtido na presente pesquisa foi a ocorrência de resistência individual e/ou múltipla das 137 cepas de *E. coli* isoladas frente aos antimicrobianos Oxitetraciclina (OTC), Tetraciclina (TET), Amoxicilina (AMO), Ácido nalidíxico (NAL) e Ampicilina (AMP). (Tabela 5 e Gráfico 3).

Tabela 5 – Número de cepas de *E. coli* classificadas em sensíveis, intermediárias e resistentes frente aos respectivos antimicrobianos testados.

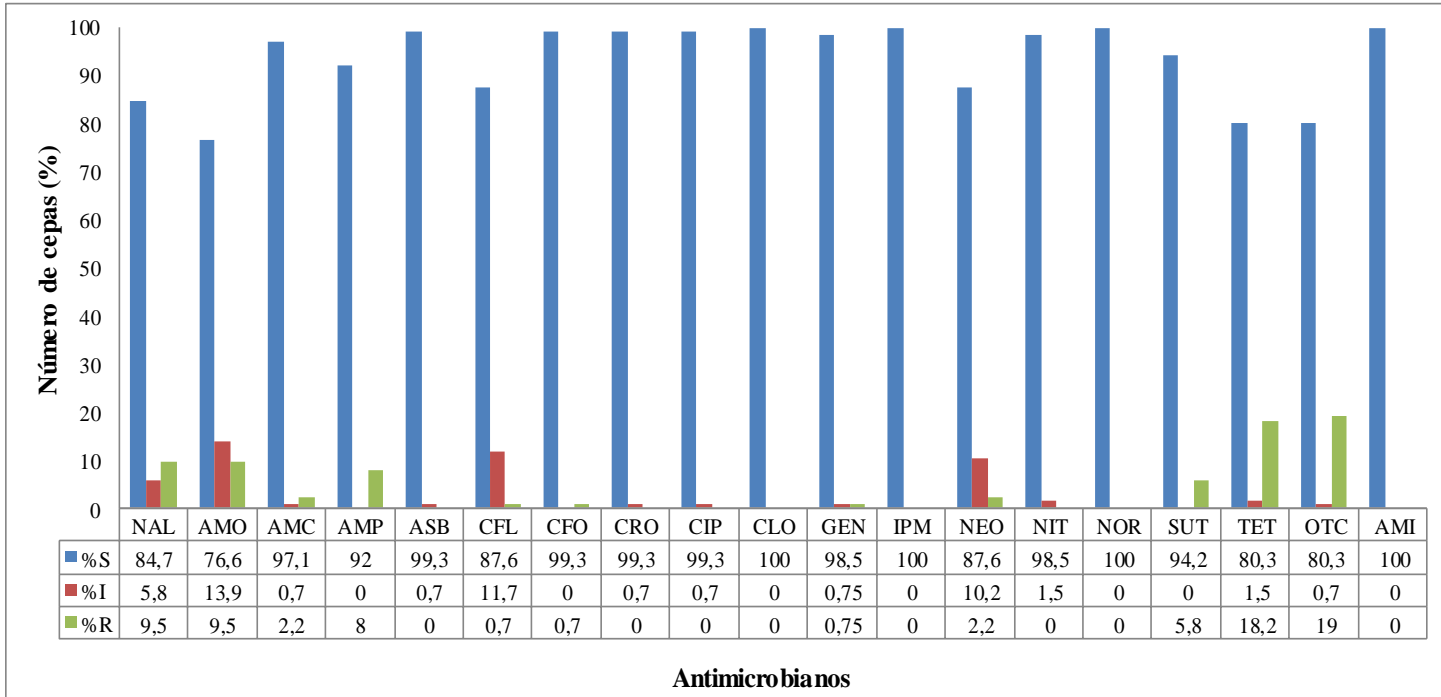
Classes	Antimicrobianos	S	I	R
Quinolonas	NAL	116 (84,7%)	9 (5,8%)	13 (9,5%)
	CIP	136 (99,3%)	1 (0,7%)	-
	NOR	137 (100%)	-	-
Penicilinas	AMO	105 (76,6%)	19 (13,9%)	13 (9,5%)
	AMP	126 (92%)	-	11 (8%)
Penicilinas com inibidores de $\beta$ -lactamase	AMC	133 (97,1%)	1 (0,7%)	3 (2,2%)
	ASB	136 (99,3%)	1 (0,7%)	-
Cefalosporinas	CFL	120 (87,6%)	16 (11,7%)	1(0,7%)
	CFO	136 (99,3%)	-	1 (0,7%)
	CRO	136 (99,3%)	1 (0,7%)	-
Fenicóis	CLO	137 (100%)	-	-
Aminoglicosídeos	AMI	137 (100%)	-	-
	GEN	135 (98,5%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)
	NEO	120 (87,6%)	14 (10,2%)	3 (2,2%)
Nitrofuranos	NIT	135 (98,5%)	2 (1,5%)	-
Carbapenêmicos	IPM	137 (100%)	-	-
Sulfonamidas	SUT	129 (94,2%)	-	8 (5,8%)
Tetraciclina	TET	110 (80,3%)	2 (1,5%)	25 (18,2%)
	OTC	110 (80,3%)	1 (0,7%)	26 (19%)

\*S: sensível. I: Intermediário. R: resistente. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. ASB: ampicilina-sulbactam. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina. CRO: ceftriaxona. CIP: ciprofloxacina. CLO; cloranfenicol. GEN: gentamicina. IPM: imipinem. NEO: neomicina. NIT; nitrofurantóina. NOR: norfloxacina. SUT: sulfazotrim. TET: tetracilina. OTC: oxitetraciclina. AMI: amicacina.

Dos 137 isolados de *E. coli* testados, aproximadamente 19% foram resistentes a oxitetraciclina e tetraciclina; e cerca de 9,5% apresentaram-se resistentes à amoxicilina e ácido nalidíxico. A resistência à eritromicina foi observada em 8% dos isolados. Por outro lado, todas as cepas mostraram-se sensíveis ao cloranfenicol, imipinem, norfloxacina e

amicacina; e mais de 98,5% foram sensíveis à ampicilina-sulbactam, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina e nitrofurantoína.

Gráfico 3 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas de amostras de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza-CE.



\*S: sensível. I: intermediário. R: resistente. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. ASB: ampicilina-sulbactam. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina. CRO: ceftriaxona. CIP: ciprofloxacina. CLO; cloranfenicol. GEN: gentamicina. IPM: imipinem. NEO: neomicina. NIT; nitrofurantoína. NOR: norfloxacina. SUT: sulfazotrim. TET: tetraciclina. OTC: oxitetraciclina. AMI: amicacina.

De acordo com informações obtidas no local de comercialização, em Fortaleza, sabe-se que as ostras comercializadas na Praia do Futuro são provenientes de estuários localizados na região próxima à cidade de Parnaíba, Estado do Piauí, onde predominam inúmeras fazendas de cultivo de camarão marinho. Os maiores percentuais de resistência foram observados para a oxitetraciclina, que é um antibiótico de uso veterinário largamente utilizado na aqüicultura (MIRANDA; ZEMELMAN, 2002). Esse esclarecimento sugere que o ecossistema manguezal de extração das ostras comercializadas esteja sendo influenciado diretamente pelos efluentes de atividades aquícolas, ocorrendo uma pressão seletiva sobre a microbiota do ecossistema manguezal, afetando também a qualidade microbiológica dos alimentos extraídos desse ambiente.

Perfis semelhantes de susceptibilidade foram descritos por Fernández-Delgado e Suárez (2009) em cepas de *E. coli* isoladas do ambiente aquático e de ostras da costa noroeste

da Venezuela. Os autores verificaram 100% de susceptibilidade aos antimicrobianos GEN, AMI, e CRO, com maiores índices para os aminoglicosídeos. Em contrapartida, as penicilinas mostraram-se menos eficientes contra a bactéria em questão, com 44% das cepas resistentes à ampicilina.

Kumar *et al.* (2005) isolaram 36% de cepas de *E. coli* oriundas de alimentos marinhos resistentes a pelo menos dois dos antimicrobianos testados, enquanto que na presente pesquisa 27% dos isolados apresentaram o mesmo perfil. Os autores também não reportaram resistência para CLO, CIP e GEN, enquanto que obtiveram baixos índices de resistência para a tetraciclina (0,86%) quando comparados aos desse estudo (18%).

Quanto às cepas de *E. coli* classificadas como intermediárias, destaca-se este perfil frente aos antimicrobianos amoxicilina (13,9%), cefalotina (11,7%) e neomicina (10,2%). Segundo Tavares (2008), os bacilos gram-negativos entéricos são, na atualidade, amplamente resistentes aos antimicrobianos tradicionalmente ativos, como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração e aminoglicosídeos.

Assim, considerando-se as cepas com perfis de resistência e intermediário, a amoxicilina destaca-se como o antimicrobiano ao qual os isolados apresentaram menor índice de susceptibilidade. A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética, derivada da ampicilina e introduzida em tratamentos clínicos no ano de 1972, apresentando suas mesmas propriedades antimicrobianas e farmacocinéticas, mas com melhor absorção via oral, apresentando também atividade bactericida mais rápida contra certos patógenos comparada com a ampicilina (ROLINSON, 1998). Corroborando com a assertiva de Tavares (2008), a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração, e a neomicina, da classe dos aminoglicosídeos, também se destacam como antimicrobianos aos quais as cepas de *E. coli* foram susceptíveis, embora com possível potencial para desenvolvimento de resistência, se considerado os elevados índices de perfis intermediários. Segundo Akond *et al.* (2009), o perfil intermediário resulta de uma possível pressão seletiva das bactérias, frente a baixas concentrações de antimicrobianos, podendo este ser considerado um indício de resistência posterior, frente à utilização de concentrações cada vez maiores para combatê-las.

Considerando-se os perfis de resistência das cepas de *E. coli* por família de antimicrobianos, observa-se uma maior recorrência de resistência frente às tetraciclinas, seguida das penicilinas. A resistência adquirida às tetraciclinas é, atualmente, bastante difundida entre as bactérias gram positivas e gram negativas, e pode ser proveniente de alterações cromossômicas resultantes de mutação ou adquirida pela transferência de plasmídios e transposons (TAVARES, 2008). Dessa forma, as classes dos carbapenêmicos e

fenicóis podem ser consideradas eficazes para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *E. coli* via consumo de ostras cruas ou parcialmente cozidas.

O Índice de Resistência a Antimicrobianos (ARI), apresentado para as cepas de *E. coli* do presente estudo, foi de 0,041, significando que houve 4,1% de recorrência de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos testados. O ARI dos isolados do líquido foi de 0,022, do músculo foi de 0,013, e do trato gastrointestinal de 0,006. Assim, observou-se maior recorrência de resistência para aquelas cepas oriundas do líquido intervalvar.

Foi observada resistência múltipla nas cepas de *E. coli* testadas (12,4%), onde o perfil mais frequente foi o de multiresistência a NAL, TET e OTC (Tabela 6). De forma geral, as cepas de *E. coli* isoladas das ostras comercializadas cruas apresentaram índice de múltipla resistência (MAR) variando entre 0,25 e 0,675.

Tabela 6 – Padrões de multiresistência a antimicrobianos entre os isolados de *E. coli* de amostras de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>n</b>	<b>MAR</b>
NAL+AMO+AMC+AMP+GEN+SUT+TET+OTC	1	0,625
AMO+AMC+CFL+CFO+TET+OTC	1	0,375
AMO+AMP+SUT+TET+OTC	3	0,375
AMO+AMP+TET+OTC	1	0,250
NAL+AMO+TET+OTC	1	0,375
NAL+TET+OTC	9	0,250
NAL+OXI	1	0,250
<b>Total</b>	<b>17 (12,4%)</b>	<b>-</b>

\*n: número de cepas. MAR: índice de múltipla resistência a antimicrobianos. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina. GEN: gentamicina. SUT: sulfazotrim. TET: tetraciclina. OTC: oxitetraciclina.

Corroborando com o presente estudo, Van *et al.* (2008) relataram índice de múltipla resistência em 67% das estirpes de *E. coli* isoladas de moluscos crus comercializados no Vietnã. Outrossim, Jeyasanta, Aiyamperumal e Patterson (2012) em estudo sobre a susceptibilidade de estirpes de *E. coli* isoladas de alimentos marinhos, incluindo moluscos, comercializados no sul da Índia, reportaram índices MAR bem mais elevados se comparados com o presente estudo, variando de 0,27 a 0,93, com 12% das cepas apresentando MAR de 0,27.

Os elevados índices de múltipla resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* encontrados neste trabalho sugerem que as ostras podem desempenhar um importante papel como reservatórios de genes de resistência e ser uma fonte de transferência dos genes que



codificam tal mecanismo de virulência para outros importantes patógenos humanos (ZULFIKI *et al.*, 2009). Ainda nesse sentido, a resistência dos isolados a diferentes classes de antimicrobianos pode estar relacionada com a contaminação do ambiente de extração das ostras por variadas fontes de poluição, como efluentes da aquicultura, agricultura e resíduos humanos, ou ainda com a dispersão de elementos genéticos móveis, como plasmídios, *integrons* e *transposons*.

Vários estudos sugerem a transmissão destes genes de resistência de alimentos marinhos contaminados para os seres humanos (OTTAVIANI *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2000), embora a taxa de transmissão seja afetada por outros fatores, como o local de origem do alimento, processamento e transporte (WEGENER; FRIMODT-MOLLER, 2000)

Dentre as cepas multirresistentes, o maior índice de isolamento foi observado para as amostras do líquido intervalvar (64,7%), sendo que o músculo e o trato gastrointestinal apresentaram o mesmo perfil de multirresistência com 17,65% de cepas, cada.

Dentre as 51 cepas de *E. coli* isoladas como possíveis subpopulações durante o teste do antibiograma, e confirmadas nesta categoria, 57% foram classificadas como intermediárias e 43% como resistentes aos respectivos antimicrobianos (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfis de resistência entre os isolados crescidos como subpopulações dentro dos halos de sensibilidade no teste de difusão em disco.

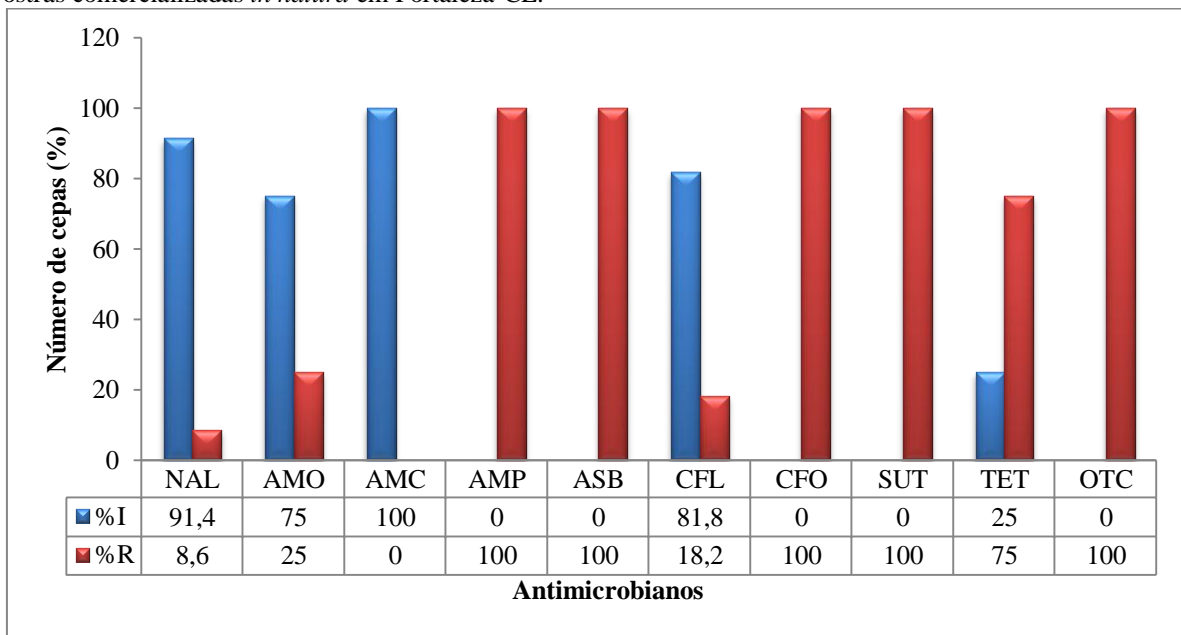
<b>Antimicrobianos</b>	<b>Subpopulações</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
NAL	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)
AMO	16	12 (75%)	4 (25%)
AMC	1	1 (100%)	-
AMP	3	-	3 (100%)
ASB	1	-	1 (100%)
CFL	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)
CFO	1	-	1 (100%)
SUT	2	-	2 (100%)
TET	4	1 (25%)	3 (75%)
OTC	5	-	5 (100%)
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>29 (57%)</b>	<b>22 (43%)</b>

\*Intermediário. R: resistente. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. ASB: ampicilina-sulbactam. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina. SUT: sulfazotrim. TET: tetraciclina. OTC: oxitetraciclina.

Diante disso, observou-se um maior número de subpopulações para os antimicrobianos amoxicilina (n = 16), cefalotina (n = 11) e ácido nalidíxico (n = 7). Quanto ao perfil de susceptibilidade, 100% das subpopulações isoladas da ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefoxitina, sulfazotrim e oxitetraciclina apresentaram-se resistentes (Gráfico 4). Para os demais antimicrobianos, dos quais foram isoladas subpopulações, estas apresentaram perfil intermediário.

As subpopulações, também conhecidas como subpopulações mutantes, são capazes de crescer dentro do halo de susceptibilidade, demonstrando, assim, a seleção de estirpes resistentes dentro de uma população susceptível a determinado antimicrobiano. Considera-se, então, que a sua presença está relacionada a uma posterior perda de ação deste agente antimicrobiano. Dessa forma, os dados obtidos na presente pesquisa confirmam essa assertiva, uma vez que as subpopulações nas culturas de *E. coli* ocorreram frente aos antimicrobianos com maior ocorrência de perfis intermediários e resistentes, tendo como exemplos: amoxicilina, cefalotina, ácido nalidíxico, tetraciclina e oxitetraciclina.

Gráfico 4 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das subpopulações de *E. coli* isoladas de amostras destras comercializadas *in natura* em Fortaleza-CE.



\*I: intermediário. R: resistente. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. ASB: ampicilina-sulbactam. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina.. SUT: sulfazotrim. TET: tetraciclina. OTC: oxitetraciclina.

Todas as cepas que apresentaram resistência (n = 42) foram submetidas à técnica de “cura” de plasmídios, que revelou um perfil de resistência potencialmente cromossômica

em 100% das cepas resistentes a AMO, AMP, CFL, CFO, SUT e TET. A maior frequência de isolados com resistência plasmidial foi observada nas estirpes resistentes a NEO (100%, n=3) e AMC (67%, n=2) (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de cepas de *E. coli*, oriundas de amostras de ostra *in natura*, classificadas de acordo com a potencial origem do fenótipo de resistência.

Antimicrobianos	n	Origem da resistência	
		cromossômica	plasmidial
NAL	13	12	1
AMO	13	13	-
AMC	3	1	2
AMP	11	11	-
CFL	1	1	-
CFO	1	1	-
GEN	1	-	1
NEO	3	-	3
SUT	8	8	-
TET	25	25	-
OTC	26	25	1
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>97 (92,4%)</b>	<b>8 (7,6%)</b>

\*n: número de cepas resistentes. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulânico. AMP: ampicilina. CFL: cefalotina. CFO: ceftioxime. GEN: gentamicina. NEO: neomicina. SUT: sulfazotrim. TET: tetraciclina. OTC: oxitetraciclina.

De acordo com Chopra e Roberts (2001), tem sido caracterizado mais de trinta genes de resistência para a tetraciclina, relacionados a elementos móveis, como plasmídios, transposons e transposons conjugativos, que têm sido transferidos entre espécies e gêneros bacterianos. Sorum e Labée-Lund (2002) relatam que os mecanismos de resistência à tetraciclina mais estudados, em bactérias gram-negativas, são aqueles codificados pelos genes *tetA*, *tetB* e *tetC*, achados tanto em plasmídios quanto nos cromossomos, predominantemente em isolados de *E. coli* de alimentos de origem animal (SENGELOV *et al*, 2003). O gene *tetA* está localizado em transposons, o gene *tetB* é considerado o mais difundido entre bactérias gram-negativas, enquanto que *tetC* é codificado por plasmídios (BRYAN; SHAPIR; SADOWSKY, 2004; FRECH; SCHWARZ, 1999). Dessa forma, a resistência relacionada à tetraciclina possivelmente está codificada por elementos cromossômicos móveis, que promovem a sua rápida disseminação dentro de uma população bacteriana, sendo necessários estudos genéticos posteriores para detecção destes genes (SUNDE; NORDSTROM, 2006).

Observou-se a ocorrência de resistência plasmidial para os antimicrobianos gentamicina e neomicina, aminoglicosídeos comumente utilizados em tratamentos de infecções por bacilos gram-negativos. Os mecanismos de resistência a estes antimicrobianos se dá através da produção de enzimas que modificam sua molécula, codificadas por uma variedade de genes, como *strA* e *strB* presentes em plasmídios e plasmídios conjugativos de bactérias como *E. coli*, *Salmonella* e *Aeromonas salmonicida* (LABÉE-LUND; SORUM, 2001; RADSTROM *et al.*, 1991; SORUM; L'ABÉE-LUND, 2002)

Dentre as subpopulações isoladas no antibiograma e classificadas como resistentes, procedeu-se à técnica de “cura” e seus perfis de resistência encontram-se detalhados na tabela 9. Foi observado um maior percentual de cepas com resistência potencialmente cromossômica, representando 91% das cepas de subpopulações de *E. coli*, sendo que apenas 9% destas apresentaram resistência plasmidial, frente aos antimicrobianos cefalotina e cefoxitina.

Tabela 9 – Número de subpopulações de *E.coli*, oriundas de amostras de ostra *in natura*, classificadas de acordo com a potencial origem do fenótipo de resistência.

Antimicrobianos	n	Origem da resistência	
		cromossômica	plasmidial
NAL	1	1	-
AMO	4	4	-
AMP	3	3	-
ASB	1	1	-
CFL	2	1	1
CFO	1	-	1
SUT	2	2	-
TET	3	3	-
OTC	5	5	-
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>20 (91%)</b>	<b>2(9%)</b>

\*n: número de cepas resistentes. NAL: ácido nalidíxico. AMO: amoxicilina. AMP: ampicilina. ASB: ampicilina-sulbactam. CFL: cefalotina. CFO: cefoxitina. SUT: sulfazotrim. TET: tetracilina. OTC: oxitetraciclina.

Caracteriza-se, assim, uma maior recorrência de resistências potencialmente cromossômicas também para as subpopulações, com exceção apenas para cefalotina e cefoxitina. Embora existam relatos na literatura relacionando tais resistências a elementos cromossomiais, é relevante citar que alguns fatores podem interferir para subestimação destes resultados, como a eficácia do agente curagênico, que nem sempre se mostra eficiente para a

completa eliminação de plasmídios com maior peso molecular, e ainda o alto índice de perda destes elementos durante a manipulação laboratorial (BROWN; THREFFALL; ROWE, 1991)

Outro teste de virulência realizado foi de detecção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) para as cepas de *E. coli* que apresentaram resistência frente às penicilinas (n = 15), estando os resultados listados na tabela 10. Para o Teste 1, todas as cepas apresentaram-se positivas para a produção da enzima (Figura 3). No Teste 2, apenas três cepas (20%) mostraram-se positivas para a produção de ESBL, com evidenciação da formação da *ghost-zone* (Figura 4), enquanto 80% foram negativas.

Tabela 10 – Resultados dos testes para detecção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido entre os isolados de *E. coli* oriundos de diferentes estruturas do corpo das ostras comercializadas *in natura*.

Detecção ESBL	nº de cepas	Positivo			nº de cepas	Negativo
		Origem dos isolados				
		L	M	TG		
<b>Teste 1</b>	15	8	4	3	-	
<b>Teste 2</b>	3	2	1	-	12	

\*L: líquido intervalvar. M: músculo. TG: trato gastrointestinal.

Figura 3 – Visualização do resultado positivo (Teste 1) para produção de ESBL observado nas cepas de *E. coli* isoladas de amostras de ostras comercializadas *in natura*.

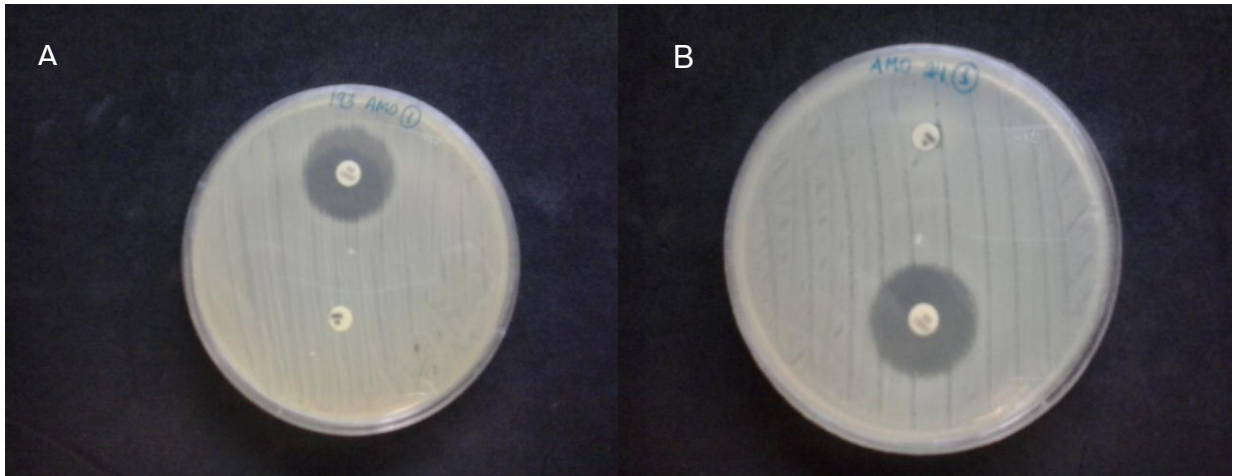
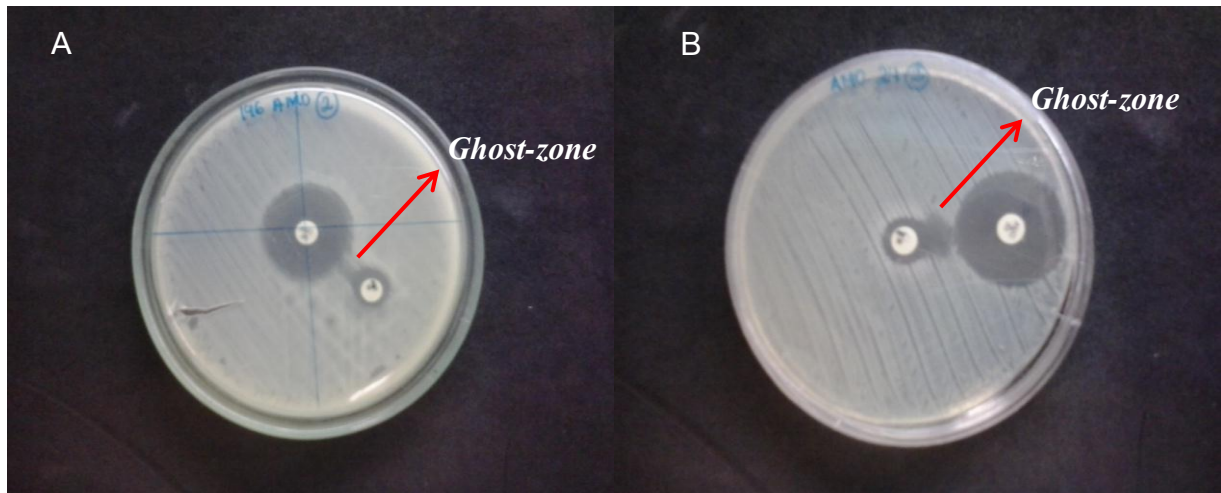


Figura 4 – Visualização do resultado positivo (Teste 2) para produção de ESBL observado nas cepas de *E. coli* isoladas de amostras de ostras comercializadas *in natura*.



Wang, Dang e Ding (2008) estudaram a ocorrência de genes beta-lactâmicos de espectro estendido resistentes à ampicilina em enterobactérias isoladas de ambiente aquático na China, e reportaram associação deste mecanismo de resistência à presença do gene *bla<sub>TEM</sub>* expressado, principalmente por *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Van *et al.* (2008) alertam que as opções terapêuticas podem ser limitadas para infecções causadas por bactérias gram-negativas portadoras de ESBL, já que os micro-organismos portadores dos genes que codificam tal mecanismo de resistência geralmente conduzem à resistência a outros antimicrobianos beta-lactâmicos.

Sousa *et al.* (2011) detectaram a presença de ESBL em cepas de *E. coli* isoladas de dourada (*Sparus aurata*) capturada na costa oeste de Portugal, relacionadas às enzimas TEM-52 e SHV-12, sugerindo que esses animais foram expostos à contaminação fecal de outros animais ou até mesmo de seres humanos no ambiente aquático de origem. Os autores alertam que esta exposição acarreta a aquisição e disseminação de bactérias resistentes e pode explicar a presença de isolados positivos para produção de ESBL.

Jiang *et al.* (2012) estudaram a presença de diversos genes associados às beta-lactamases resistentes à ampicilina em cepas de *E. coli* isoladas de peixes oriundos de cultivo, comercializados na China. Estes autores reportaram 79% das cepas como resistentes à ampicilina e 12% destas apresentavam os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* que expressam as enzimas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido.

Os resultados da presente pesquisa concernentes à presença de enzimas beta-lactamases de espectro estendido em cepas de *E. coli* associadas à ambientes não-hospitalares, neste caso o estuário de origem das ostras comercializadas, podem ter implicações para a

saúde humana, uma vez que esta resistência pode ser transferida aos homens através destes alimentos.

Assim, a presença de ESBL pode ser considerada um fator adicional de virulência para as cepas de *E. coli* isoladas de alimentos, restringindo a administração correta de possíveis drogas eficazes para combater uma gastroenterite causada pelo consumo de alimentos marinhos, especialmente moluscos bivalves crus ou mal cozidos.

Foi observado, para os dois testes, que houve um maior índice de cepas positivas para a produção de ESBL para aquelas originárias do líquido intervalvar, com oito cepas positivas (53%) para o Teste 1 e duas (67%) para o Teste 2. Por outro lado, houve um menor índice de positividade para as cepas oriundas do trato gastrointestinal.

No presente estudo, nenhuma das cepas multiresistentes testadas apresentaram positividade para o teste de agregação em superfície de vidro, outro teste de virulência realizado, podendo-se sugerir que possivelmente estas não eram formadoras de biofilme.

De acordo com Costerton, Stewart e Greenberg (1999), as bactérias ambientais geralmente aderem ou se associam a algum substrato, formando biofilmes. Dentre os microorganismos produtores de biofilme, muitas estirpes de *E. coli* possuem a capacidade de agregação e empregam uma gama de diferentes métodos para esse fim (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005).

A produção de biofilme é considerada um fator de virulência frequentemente associado a estirpes de *E. coli* do tipo enteroagregativas (EAEC) e difusamente agregadas (DAEC), codificadas por fímbrias presentes em plasmídios associados a essas bactérias (HWANG *et al.*, 2010; SHERLOCK *et al.*, 2004). De acordo com Bernier, Gounon e LeBouguéne (2002) a patogenicidade de estirpes EAEC é definida por uma Aderência Agregativa (AA), que acarreta diarreia persistente principalmente em crianças de países em desenvolvimento. Estudos descritos na literatura apontam que a maioria das estirpes EAEC abrigam um plasmídio de 60 a 65-MDa que codificam a produção de fímbrias, principal mecanismo de aderência bacteriana (NATARO *et al.*, 1993).

Ghigo (2001) destaca a importância da relação entre o processo de conjugação e a formação de biofilmes, o que pode aumentar os riscos de infecção relacionados a esse mecanismo de virulência e uma maior facilidade de disseminação desses fatores. Dessa forma, torna-se necessária a posterior investigação dos sorogrupos isolados neste estudo, bem como a detecção destes elementos móveis, que podem ser perdidos durante a manipulação dos isolados em laboratório (BROWN; THREFFALL; ROWE, 1991).

## 6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa sustenta as seguintes conclusões:

1. As ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza apresentaram-se fora dos limites estabelecidos pela legislação da ANVISA (RDC, 2001), no tocante à presença de coliformes termotolerantes a 45°C.
2. A maioria das amostras de ostras comercializadas em Fortaleza deve passar por processo de depuração antes da comercialização, segundo a Instrução Normativa do Programa de Controle Sanitário de Moluscos Bivalves (MPA, 2012).
3. A frequência de cepas bacterianas resistentes à oxitetraciclina sugere uma pressão seletiva sobre a microbiota do ambiente de origem das ostras.
4. A presença de múltipla resistência aos antimicrobianos e ainda de beta-lactamases de espectro estendido pode ser indicativo de risco para os consumidores de ostra *in natura*.
5. O líquido intervalvar apresentou-se como fluido concentrador de biomassa bacteriana, com índices mais elevados de resistência e de produção de ESBL.



## REFERÊNCIAS

- AKOND, M. A.; HASSAN, S. M. R.; ALAM, S.; SHRIN, M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. **American Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 5, n. 1, p. 47-52, jan-mar. 2009.
- ALEXANDER, T. W.; INGLIS, G. D.; YANKE, L. J.; TOPP, E.; READ, R. R.; REUTER, T.; MCALLISTER, T. A. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 40-48, jan. 2010.
- ALLAM, B.; PAILLARD, C. Defense factors in clam extrapallial fluids. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 33, n. 2, p. 123-128, jun. 1998.
- ALMEIDA, C.; SOARES, F. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): A 20 years of sanitary survey. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 252-262, fev. 2012.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, Cambridge, v. 29, n.3, p. 331-349, sept. 2002.
- AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, Barking, v.45, n. 2, p. 780-788, mar. 2012.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, Salvador, v. 12, n. 6, p. 526-530. dez. 2008.
- AUGUSTI, G. R.; SUPERTI, S.; ZAVASCHI, A. P. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 192-196, out./dez. 2007.
- AURELI, P.; FERRINI, A. M.; MANNONI, V.; HODZIC, S.; WEDELL-WEERGAARD, C.; OLIVA, B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, p. 325-330. 2003.
- BARBOSA, R. C.; SILVA, C. M. S.; HIZUKN, S. M.; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M. R. E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de screening. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 17-24, jun. 1999/2000.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III-Encoding Operon in Enterococcal *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF-Encoding Operon Family. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, aug. 2002.
- BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Review: Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **International Journal of Nephrology**, New York, v. 2012, mar. 2012.

BLAKE, D. P.; HUMPHRY, R. W.; SCOTT, K. P.; HILLMAN, K.; FENLON, D. R.; LOW, J. C. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 1087-1097, 2003.

BLODGETT, R. Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. In: **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Bacteriological Analytical Manual on line**. 2006.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2013.

BONNET, R. Minireview: Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 1, p. 1-14, jan. 2004.

BOUCHEZ, A.; PASCAULT, N.; CHARDON, C.; BOUVY, M.; CECCHI, P.; LAMBS, L.; HERTEMAN, M.; FROMARD, F.; GOT, P.; LÉBOULANGER, C. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 66, n. 1-2, p. 39-46, jan. 2012.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 4, p. 993-951, oct. 2001.

BRAIOS, A. Incidência de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em um hospital universitário. **Colloquium Vitae**, Presidente Prudente, v. 1, n. 2, p. 109-116, 2009.

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

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 11 jan. 2013.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/res_conama_357_05.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Lei Nº 7 de 8 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/INs/IN\\_2012.doc](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/INs/IN_2012.doc)>. Acesso em: 23 jan. 2013.

BRAUWEWRE, A.; BRYE, B.; SERVAIS, P.; PASSERAT, J.; DELEERSNIJDER, E. Modelling *Escherichia coli* concentrations in the tidal Scheldt river and estuary. **Water Research**, New York, v. 45, p. 2724-2738, 2011.

BROWN, D. J.; THREFFALL, E. J.; ROWE, B. Instability of multiple drug resistance plasmid. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 106, p. 247-257, 1991.

BRYAN, A. B.; SHAPIR, N.; SADOWSKY, M. J. Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2503-2507, apr. 2004.

BUITRAGO, J.; RADA, M.; HERNÁNDEZ, H.; BUITRAGO, E. A Single-Use Site Selection Technique, Using GIS, for Aquaculture Planning: Choosing Locations for Mangrove Oyster Raft Culture in Margarita Island, Venezuela. **Environmental Management**, New York, v. 35, n. 5, p. 544-556. 2005.

BURTON, E.; YAKANDAWALA, E. N.; LO VETRI, E. K. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 34, p. 1-4, 2007.

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

CAMPOS, C. J. A.; ACORNLEY, R.; MORGAN, O. C.; KERSHAW, S. Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999–2008. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 64, n. 12, dec. 2012.

CHAUDHURI, B. N.; RODRIGUES, C.; BALAJI, V.; IYER, R.; SEKAR, U.; WATTAL, C.; CHITNIS, D. S.; DHOLES, T. N.; JOSHI, S. Incidence of ESBL Producers amongst Gram-negative Bacilli Isolated from Intra-abdominal Infections across India (Based on SMART Study, 2007 Data). **Journal of the Association of Physicians of India**, Bombay, v. 59, p. 287-292, may. 2011.

CHEN, Y.; LIU, X. M.; YAN, J. W.; LI, X. G.; MEI, L. L.; MA, Q. F.; MA, Y. Foodborne Pathogens in Retail Oysters in South China. **Biomedical And Environmental Sciences**, Orlando, v. 23, p. 32-36, 2010.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 65, n. 2, p. 232-260, jun. 2001.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 37, n. 1, p. 318-326, jul, 1982.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 22, n. 6, dec. 1985.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2011.

CONEJO-JUÁREZ, P.; PÉREZ-JIMÉNEZ, C.; SILVA-SÁNCHEZ, J.; VELÁZQUEZ-ACOSTA, C.; GONZÁLEZ-LARA, F.; REYNA-FLORES, F.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; VOLKOW-FERNÁNDEZ, P. Molecular Analysis and Risk Factors for *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Bloodstream Infection in Hematological Malignancies. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 1-8, apr. 2012.

CONSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 51, p. 218-223, 2005.

COSTERTON, J. W.; EWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Minireview: Biofilms, the Customized Microniche. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 8, p. 2137-2142, apr. 1994.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBARG, E. P. Review: Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, Washington, v. 284, p.1318-1322, may. 1999.

CULLER, H. F. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CUNIN, P.; TEDJOUKA, E.; GERMANI, Y.; NCHARRE, C.; BERCIÓN, R.; MORVAN, J.; MARTIN, P. M. V. An Epidemic of Bloody Diarrhea: *Escherichia coli* O157 Emerging in Cameroon? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 2, p.285-290, mar-apr. 1999.

DANG, H.; REN, J.; SONG, L.; SUN, S.; AN, L. Diverse Tetracycline Resistant Bacteria and Resistance Genes from Coastal Waters of Jiaozhou Bay. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 237-246. 2008.

DATTA, D.; CHATTOPADHYAY, R. N.; GUHA, P. Review: Community based mangrove management: A review on status and sustainability. **Journal of Environmental Management**, London, v 107, p. 84-95, 2012.

DEPAOLA, A.; KAYSNER, C. A.; BOWERS, J.; COOK, D. Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after Outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4649-4654, nov. 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 277S-281S, mar–apr. 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, sep. 2002.

- DUAN, R. S.; SIT, T. H. C.; WONG, S. S. Y.; WONG, R. C. W.; CHOW, K. H.; MAK, G. C.; NG, L. T.; YAM, W. C.; YUEN, K. Y.; HO, P. L. *Escherichia coli* Producing CTX-M  $\beta$ -Lactamases in Food Animals in Hong Kong. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 12, n. 1, p. 145-150, 2006.
- EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 1068S-1168S, 2000.
- EMBAREK, P. K. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p. 17-34, 1994.
- ESPINO, R.; GUTIERREZ, E. R. F. Cultivo de ostión a mar abierto. **Revista Asociación Cubana de Producción Animal (ACPA)**, La Habana, v. 1, p. 19-20, 2010.
- ESTRADA-GARCIA, T.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPSON-BONILLA, R.; ABONCE, M. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 93-98, jan. 2009.
- EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, F. C. T.; TORRES, R. C. O.; SANT'ANNA, E. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, C. M. F. *Aeromonas spp.* isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 129-133, may-jun. 2006.
- FAO . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. **El Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura**, Roma, 2012. Disponível em: <  
<http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2012.
- FELDHUSEN, F. Review: The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 1651-1660, 2000.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. **Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria**. 2002. Disponível em : <  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM064948>>. Acesso em: 18 jul. 2013.
- FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; SUÁREZ, P. Multiple antibiotic resistances of enteric bacteria isolated from recreational coastal waters and oysters of the Caribbean Sea. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 59, n. 3, p. 409-414, 2009.
- FLEMING, L. E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A.; POMPONI, S. A.; SMITH, S.; SOLO-GABRIELE, H.; WALSH, P. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 53, p. 545-560, 2006.
- FONTELES-FILHO, A. A. **Oceanografia, biologia e dinâmica populacional dos recursos pesqueiros**. Fortaleza, CE: Expressão Gráfica, 2011. 464p.

- FRECH, G.; SCHWARZ, S. Plasmid-encoded tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovars *cholera-suis* and *typhimurium*: identification of complete and truncated Tn 1721 elements. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 1, jul. 1999.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, p. 872-874, 1989.
- FRENCH, G. L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 1514– 1527, 2005.
- FRÍAS, J. A.; RODRIGUES, R. Oyster in Cuba: **Current State, Techniques and Industry Organization**. In: Culture in the Caribbean Workshop. Kingston, IDRC, p. 51-74, 1991.
- FROELICH, B.; OLIVER, J. D. Minireviews: The Interactions of *Vibrio vulnificus* and the Oyster *Crassostrea virginica*. **Microbial Ecology**, jan. 2013.
- FU, L. L.; SHUAI, J. B.; WANG, Y.; MAA, H. J.; LI, J. R. Temporal genetic variability and host sources of *Escherichia coli* associated with fecal pollution from domesticated animals in the shellfish culture environment of Xiangshan Bay, East China Sea. **Environmental Pollution**, London, v. 159, p. 2808-2814, 2011.
- GALVÃO, M. S. N.; PEREIRA, O. M.; MACHADO, I. C.; PIMENTEL, C. M. M.; HENRIQUES, M. B. Desempenho da criação da ostra de mangue *Crassostrea* sp. a partir da fase juvenil, em sistema suspenso, no Estuário de Cananéia e no Mar de Ubatuba (SP, Brasil). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.35, n. 3, p. 401-411, 2009.
- GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, London, v. 412, p. 442-445, 2001.
- GOMEZ, H. C.; BAYONA, A. L. L. In: BAYONA, A. L. L.; DAZA, P. D.; OCHOA, A. I. S. (Eds). **La ostra de Caribe *Crassostrea rhizophorae*: uma alternativa de maricultura**. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: INCODER, 2007. 156 p.
- GONZÁLEZ, M.; VILLALOBOS, L. B.; VÁSQUES-SUÁREZ, A.; GRAU, C.; GIL, H. Enumeración de aeróbios mesófilos, coliformes fecales y *Clostridium perfringens* em la ostra *Crassostrea rhizophorae* procedente de Laguna Grande del Obispo, Estado Sucre, Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ**, Mérida, v. 21, n. 1, p. 80-87, 2011.
- GOURMELON, M.; MONTET, M. P.; LOZACH, S.; LE MENNEC, C.; POMMEPUY, M.; BEUTIN, L.; VERNZOY-ROZAND, C. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 85-97, 2006.
- GOW, S. P.; WALDNER, C. L.; HAREL, J.; BOERLIN, P. Associations between Antimicrobial Resistance Genes in Fecal Generic *Escherichia coli* Isolates from Cow-Calf Herds in Western Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 12, p. 3658–3666, jun. 2008.

GRASSI, M. A.; CIVERA, T.; TURI, R. M. Isolation of Cytotoxic *Aeromonas spp.* from Food. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 27, p. S305-S306, 2003.

GUARNER, F.; MELAGELADA, J. R. Review: Gut flora in health and disease. **The Lancet**, London, v. 361, p. 512-519, feb. 2003.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Revisão: Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAN, F.; WALKER, R. D.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B. Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Isolates from Louisiana Gulf and Retail Raw Oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 7096–7098, nov. 2007.

HENRIQUES, I. S.; FONSECA, F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; CORREIA, A. Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, p. 938-947, 2006.

HERNÁNDEZ, O.D.; TROCCOLI, L.G; MILLIÁN, Y.J.Q. Crecimiento, engorde y sobrevivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1928 em la Isla de Cubagua, Venezuela. **Caribbean. Journal of Science**, Puerto Rico, v. 34, n. 3-4, p.243-249. 1998.

HERWIG, R. P.; GRAY, J. P.; WESTON, D. P. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. **Aquaculture**, Asheville, v. 149 p. 263-283, 1997.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLINC, S.; CIOFUB, O. Review: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, p. 322-332, 2010.

HWANG, J. MATTEI, L. M.; VANARENDONK, L. G.; MENEELY, P. M.; OKEKE, I. N. A Pathoadaptive Deletion in an Enteroaggregative *Escherichia coli* Outbreak Strain Enhances Virulence in a *Caenorhabditis elegans* Model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 9, p. 4068-4076, sept. 2010.

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

JAIN, A.; AGARWALL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, p. 88-92, 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711 p.

JEYASANTA, K. I.; AIYAMPERUMAL, V.; PATTERSON, J. Prevalence of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* in Sea Foods of Tuticorin Coast, Southeastern India. **Advances in Biological Research**, Tokyo, v. 6, n. 2, p. 70-77, 2012.

- JIANG, H. X.; TANG, D.; LIU, Y. H.; ZHANG, X. H.; ZENG, Z. L.; XU, L.; HAWKEY, P. M. Prevalence and characteristics of b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, p. 2350-2353, 2012.
- JONES, J. G.; GARDNER, S.; SIMON, B. M.; PICKUP, R. W. Factors affecting the measurement of antibiotic resistance in bacteria isolated from lake water. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 455–46, Jan. 1986.
- JORGENSEN, J. H; TURNIDGE, J. D.; WASHINGTON, J. A. Antimicrobial Susceptibility Testing: Dilution and Disk Diffusion. *In*: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 2005. cap. 118, p. 1526-1543.
- JOUINI, A.; VINUÉ, E.; SLAMA, K. B.; SAÉNZ, Y.; KLIBI, N.; HAMMAMI, S.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 60, p. 1137–1141, 2007.
- KAISER, T. D. L. **Análise da produção de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* hospitalares e da comunidade por diferentes métodos**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, feb. 2004.
- KAY, D.; BARTRAMB, J.; PRUSS, A.; ASHBOLT, N.; WYER, M. D.; FLEISHER, J. M.; FEWTRELL, L.; ROGERS, A.; REES, G. Derivation of numerical values for the World Health Organization guidelines for recreational waters. **Water Research**, New York, v. 38, p. 1296-1304, 2004.
- KEENE, W. E.; MCANULTY, J. M.; HOESLY, F. C.; WILLIAMS, L. P.; HEDBERG, K.; OXMAN, G. L.; BARRETT, T. J.; PFALLER, M. A.; FLEMING, D. W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 331, n. 9, p. 579-584, sept. 1994.
- KEMPER, N. Review: Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological indicators**, Amsterdam, v. 8, p. 1-13, 2008.
- KIRS, M.; VAN LAANEN, A.; COTTON, D.; DEPAOLA, A.; JONES, J.; KRANTZ, J.; HEUBERGER, A.; VAN LOON, N.; FYFE, R. **A Survey of Commercially Harvested North Island Oysters (*Crassostrea gigas*) for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus***. 2010. NZFSA: Cawthron Report, n. 1749. 21 p.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 165-170, jul. 1983.



KUEH, C. S. W. Uptake, retention and elimination of enteric bacteria in bivalve molluscs. **Asian Marine Biology**, v. 4, p. 113-128, 1987.

KUMAR, H. S.; PARVATHI, A.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 619-623, 2005.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.54, p.311-320, jun. 2004.

LABÉE-LUND, T. M.; SORUM, H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. **Microbial Drug Resistance**, Lordmont, v. 7, n. 3, p. 263-272, sept. 2001.

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; HOYLE, B. D.; COSTERTON, J. W.; CALDWELL, D. E. Optical Sectioning of Microbial Biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, oct. 1991.

LEE, R. J.; YOUNGER, A. D. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 50, p. 177-183, 2002.

LENZ, T. M. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais-Ecologia), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.

LEVINTON, J. S. **Marine Biology: function, biodiversity, ecology**, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2011. 588p.

LIBERTO, M. C.; MATERA, G.; QUIRINO, A.; LAMBERTI, A. G.; CAPICOTTO, R.; PUCCIO, R.; BARRECA, G. S.; FOCÁ, E.; CASCIO, A.; FOCÀ, A. Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 522-528, 2009.

LODEIROS-SEIJO, C.; FREITES-VALBUENA, L. Estado actual y perspectivas del cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela. In: LOVATELLI, A.; FARIAS, A.; URIARTE, I. (Eds). **Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO**. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 135-150.

LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Trends in Production of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1659-1664, may. 2006.

LYNCH, S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. **The Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 59, p. 415-428, 2008.

MAALOUF, H.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. S. Environmental Conditions Leading to Shellfish Contamination and Related Outbreaks. **Food and Environmental Virology**, New York, v. 2, p. 136-145, 2010.

MACCACHERO, G. B.; GUZENSKI, J.; FERREIRA, J. F. Crescimento alométrico em ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), cultivada no Sul do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n.3, p. 400-403, 2005.

MACHADO, I. C.; KOGA, S. M.; WOIOECHOVSKY, E.; GELLI, D. S. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia-SP, Brasil, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*). 2 – Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

MARTINEZ, J. L. Review: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, London, v. 157, p 2893-2902, 2009.

MCLAUGHLIN, J. B.; DEPAOLA, A.; BOPP, C. A.; MARTINEK, K. A.; NAPOLILLI, N. P.; ALLISON, C. G.; MURRAY, S. L.; THOMPSON, E. C.; BIRD, M. M.; MIDDLEAUGH, J. P. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 353, p. 1463-1470, 2005.

MENDES, E. S.; MENDES, P. P.; LOPES, C. A. M.; COELHO, M. I. S.; SOUZA, J. C. R.; CRUZ, M. C. S.; ASSIS, A. S. Sazonalidade dos micro-organismos em ostras consumidas na Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116, p. 79-87, jan/fev. 2004.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods**, 4. th. Washington: APHA, 2001, cap. 35, 676p.

MEUNIER, D.; JOUY, E.; LAZIZZERA, C.; KOBISCH, M.; MADECA, J. Y. CTX-M-1- and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 28, p. 402-407, 2006.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, Asheville, v. 212, p. 31-47, 2002.

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

MORELLI, A. M. F. **Isolamento de enterococos e coliformes fecais de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará**. 2003. 105f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

MORRISSON, C. M.; ARMSTRONG, A. E.; EVANS, S.; MILD, R. M.; LANGDON, C. J.; JOENS, L. A. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, p. 93-98, 2011.

MUÑOZ, D.; MARÍN, C. G.; VILLALOBOS, L. B.; MARTÍNEZ, C.; ZERPA, A. Indicadores bacterianos en los mejillones *Perna perna* (Linné, 1758) y *P. viridis* (Linné, 1758) en las aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del Estado Sucre, Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ**, Mérida, v. 18, n. 5, p. 595-606, 2008.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; GIRON, J. A.; SAVARINO, S. J.; KOTHARY, M. H.; HALL, R. Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli* Requires Two Unlinked Plasmid Regions. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1126-1131, mar. 1993.

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. **Manual of operations: sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish**. Washington, 1997. Part II.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases: The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, p. S3-S15, 2010.

NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 359-363, nov. 2000.

NOBRE, R. C. **Os animais de nossas praias**. 2. ed. São Paulo: Edart, 1973. 187 p.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; SOUZA, H. A. P. H. M.; COGO, L. L.; COSTA, L. M. D. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in Enterobacteriaceae Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 6, p. 390-395, 2006.

NYBAKKEN, J. W.; BERTNESS, M. D. **Marine Biology: an ecological approach**. 6th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2005. 579p.

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2007. 612p.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Legislation. L268, v. 34, p. 1-14, sept. 1991. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1991:268:FULL:EN:PDF>>. Acesso em: 14 de jan. 2013.

OLGUNOGLU , I. A. In: MAHMOUD, B. S. M. D. (Ed.). **Salmonella: a dangerous foodborne pathogen**. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/salmonella-in-fish-and-fishery-products>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

OLIVEIRA, C. F.; DAL FORNO, N. L. F.; ALVES, I. A.; HORTA, J. A.; RIEGER, A.; ALVES, S. H. Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 5, p. 556-560, set-out. 2009.

OTTAVIANI, D.; BACCHIOCCHI, I.; MASINI, L.; LEONI, F.; CARRATURO, A.; GIAMMARIOLI, M.; SBARAGLIA, G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 135-140, 2001.

PAIXÃO, L.; FERREIRA, M. A.; NUNES, Z.; FONSECA-SIZO, F.; ROCHA, R. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture**, Asheville, v. 6, n. 12, p. 380-383, 2013.

PAPADOPOULOU, C.; ECONOMOU, E.; ZAKAS, G.; SALAMOURA, C.; DONTOROU, C.; APOSTOLOU, J. Microbiological and Pathogenic Contaminants of Seafood in Greece. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 30, p. 28-42, 2007.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, oct. 2005.

PELCZAR, M. J.; REID, R. D.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980-1981. 2 v. 1072 p.

PEREIRA, O. M.; GELLI, V.C.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C.; BASTOS, A. A. **Programa de desenvolvimento da criação ordenada de moluscos bivalves no Estado de São Paulo**. Instituto de Pesca; Agência paulista de tecnologia de Agronegócios; Secretaria de Agricultura e Abastecimento. 2000. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/realtec2.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2012.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 19-28, 2003.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; BONOMO, R. A. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology**, London, v. 7, p. 459-469, 2007.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, p. S153-S163, 2006.

POLI, C. R.; LITTLEPAGE, J. **Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina**. Anais do Aquicultura Brasil. 1998. Disponível em: <[http://www.lmm.ufsc.br/data/files/cultivo\\_em\\_sc.pdf](http://www.lmm.ufsc.br/data/files/cultivo_em_sc.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2012.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.35, p. 921-928, 2002.

PROGRAMA BRASILEIRO DE INTERCÂMBIO EM MARICULTURA. **Cultivo de ostras**. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2003. 30p. (Manuais de Maricultura, 2).

RADSTROM, P.; SWEDBERG, G.; SKOLD, O. Genetic Analyses of Sulfonamide Resistance and Its Dissemination in Gram-Negative Bacteria Illustrate New Aspects of R Plasmid Evolution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 35, n. 9, p. 1840-1848, sept. 1991.

REZENDE, C. E.; LACERDA, R. D.; BERNINI, E.; SILVA, C. A. R.; OVALLE, A. R. C.; ARAGON, G. T. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 2. ed. São Paulo: Interciência, 2009. 631p.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, L. *In*: RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. (Coord.). **Invertebrados: Manual de Aulas Práticas**. 2. ed. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2006. 271 p.

RIOS, E. C. **Brazilian Marine Mollusks Iconography**. Rio Grande, RS: Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 482 p.

RIPPEY, S. R. Infectious Diseases Associated with Molluscan Shellfish Consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 4, p. 419-425, oct. 1994.

RODAS-SUÁREZ, O. R.; FLORES-PEDROCHE, J. F.; BETANCOURT-RULE, J. M.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I.; VÁZQUEZ-SALINAS, C. Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Oysters, Fish, and Estuarine Water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 11, p. 7410-7412, nov. 2006.

RODRIGUEZ, G. *In*: CASTELLVÍ, J. **Ecología Marina**. Caracas: Estación de Investigaciones Marinas de Margarita: Editorial Dossat (Fundación La Salle de Ciencias Naturales, 14). 1972. 711p.

ROLINSON, G. N. Forty years of  $\beta$ -lactam research. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 41, p. 589-603, 1998.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. *In*: **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7th ed. São Paulo: Roca, 2005.

- RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n.1, p.247-254, jan. 2005.
- RYU, S. H.; PARK, S. G.; CHOI, S. M.; HWANG, Y. O.; HAM, H. J.; KIM, S. U.; LEE, Y. K.; KIM, M. S.; PARK, G. Y.; KIM, K. S.; CHAE, Y. Z. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 152, p. 14-18, 2012.
- SABRY, R. C.; GESTEIRA, T. C. V.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO, M. A.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L. P.; VIANNA, R. T.; SILVA, P. M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, p. 24-32, 2013.
- SANTOS, D. F.; PIMENTA, F. C.; ALVES, R.; MONTALVÃO, E. R.; SANTOS, D. B.; FILHO, J. R. C. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 608-612, 2008.
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Review: Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, New York, v. 34, p. 1215-1226, 2008.
- SCHMIEGELOW, J. M. M. **O planeta azul: uma introdução às ciências marinhas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 202 p.
- SCHWARTZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. R. Review: Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, p. 431-437, 2001.
- SCHWARTZ, D. J.; CHEN, S. L.; HULTGREN, S. J.; SEED, P. C. Population Dynamics and Niche Distribution of Uropathogenic *Escherichia coli* during Acute and Chronic Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n. 10, p. 4250-4259, oct. 2011.
- SENGELOV, G.; HALLING-SORENSEN, B.; AARESTRUP, F. M. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 91-101, 2003.
- SHEIK, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.
- SHERLOCK, O.; SCHEMBRI, M. A.; REISNER, A.; KLEMM, P. Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *Escherichia coli* – cell aggregation and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 8058-8065, 2004.

- SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA Adhesin/Invasin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is Self-Recognizing and Induces Bacterial Aggregation and Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1954-1963, apr. 2005.
- SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; MENEZES, F. G. R.; FONTELES-FILHO, A. A.; TORRES, R. C. O.; SANT'ANNA, E. S. Bacteria of Fecal Origin In Mangrove Oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó River Estuary, Ceará State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 126-130, 2003.
- SILVA, D. **Resíduo sólido da malacocultura: caracterização e potencialidade de utilização de conchas de ostras e mexilhão**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- SORUM, H.; LABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, p. 43-56, 2002.
- SOUSA, M.; TORRES, C.; BARROS, J.; SOMALO, S.; IGREJAS, G.; POETA, P. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) as Carriers of SHV-12 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing *Escherichia coli* Isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 10, p. 1139-1141, 2011.
- SOUZA, R. V.; VICENTE, A. L.; SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; OSTRENSKY, A. Malacocultura em Santa Catarina: maricultores, extensionistas e pesquisadores apontam problemas e demandas. **Panorama da aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 123, p. 36-41, jan-fev. 2011.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Review: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, London, v. 358, p. 135-138, jul. 2001.
- STRATEV, D.; VASHIN, I.; RUSEV, V. Prevalence and survival of *Aeromonas* spp. in foods – a review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 163, n. 10, p. 486-494, 2012.
- SUNDE, M.; NORDSTROM, M. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 58, p. 741-747, 2006.
- TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. São Paulo: Atheneu, 2008. 586 p.
- TORRES, R. C. O. *In*: VIEIRA, R. H. S. F. (Coord). **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Varela, 2004. 380 p.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals – prejudices, perceptions and realities. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, p. 26-27, 2004.

VAN, T. T. H.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L. T.; COLOE, P. J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 217-223, 2008.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Varela. 2004. 380 p.

VILLARROEL, E.; BUITRAGO, E.; LODEIROS, C. Identificación de factores ambientales que afectan al crecimiento y la supervivencia de *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bivalvia) bajo condiciones de cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias/Universidad del Zulia**, Maracaibo, v. 14, n. 1, p. 28-35, 2004.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 1, p. 65-70, oct. 2003.

WANG, C.; DANG, E. H.; DING, E. Y. Incidence of diverse integrons and  $\beta$ -lactamase genes in environmental Enterobacteriaceae isolates from Jiaozhou Bay, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 2889–2896, 2008.

WEGENER, H. C.; FRIMODT-MOLLER, N. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 111-113, feb. 2000.

WHITE, P. A.; MCLVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, sept. 2001.

WILES, T. J.; KULESUS, W. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 85, p. 11-19, 2008.

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. C. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from Food Poisoning Outbreaks during 1992-1995 in Taiwan. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 7, p. 900-906, jul. 2000.

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