

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP- CAUNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA  
PLASMIDIAL DE CEPAS DE *SALMONELLA* spp ISOLADAS DE  
DOIS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO CEARÁ - BRASIL**

**Francileide Vieira Figueirêdo  
Bióloga**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Agosto de 2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E  
RESISTÊNCIA PLASMIDIAL DE CEPAS DE *SALMONELLA*  
spp ISOLADAS DE DOIS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO  
CEARÁ - BRASIL**

**Francileide Vieira Figueirêdo**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regine H. S. dos Fernandes Vieira

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-Unesp/SP

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Agosto de 2008**

F475s Figueirêdo, Francileide Vieira  
Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de *Salmonella* spp isoladas de dois estuários do Estado do Ceará, Brasil. Jaboticabal, 2008  
v, 54 f. : il. ; 28

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da Unesp, 2008  
Orientador: Julieta Rodini Engrácia de Moraes  
Banca examinadora: Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, Fabiana Pilarsky, Fabiana Rizzi Bozzo, Gilson Pereira Oliveira.

#### Bibliografia

1. Antimicrobianos. 2. Carcinicultura. 3. Estuários. 4. *Salmonella* sp I.  
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura da Unesp

CDU 639.512

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FRANCILEIDE VIEIRA FIGUEIRÊDO** - nascida em 16 de janeiro de 1964, em Martinópolis, SP. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, em janeiro de 1989. Especialista em Bioecologia pela UFRN, em setembro de 1997. Participou de estágio em classificação, morfologia, biologia, transmissão, patogenicidade e profilaxia de parasitos de peixes amazônicos no Laboratório de Parasitologia e Patologia de Peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA-Manaus-AM em novembro de 1998. Mestre em Bioecologia Aquática, Área de concentração: Parasitologia de Peixes, junto ao Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN - Natal – RN, em outubro de 1999. Realizou estágio em pesquisa de *Vibrio* em aquicultura no período de junho a agosto de 2006, e em pesquisa de Enterobactérias em ambiente aquático e Resistência bacteriana no período de setembro a novembro de 2006 no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza-CE. Doutora em Aquicultura, Área de concentração: Patologia de Organismos Aquáticos pelo Centro de Aquicultura da UNESP- CAUNESP - Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – SP, em agosto de 2008. Professora da Secretaria Estadual de Educação, Cultura e Desportos do Estado do Rio Grande do Norte e da Secretaria Municipal de Educação de Natal-RN.

*O futuro não nos faz.  
Nós é que nos refazemos  
na luta para fazê-lo.*

*- Paulo Freire -*

*Eu tenho uma espécie de dever,  
dever de sonhar, de sonhar sempre,  
pois sendo mais do que um espetáculo de mim mesmo,  
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.  
E, assim, me construo a ouro e sedas,  
em salas supostas, invento palco,  
cenário para viver o meu sonho  
entre luzes brandas e  
músicas invisíveis.*

- Fernando Pessoa -

## **DEDICO**

A minha mãe Francisca, pela compreensão,  
paciência e por ter suportado a saudade  
nessa minha ausência...

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

À minha orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Julieta Rondini Engrácia de Moraes pela confiança quando aceitou me orientar, e pela liberdade que me deu nas tomadas de decisões mais importantes, respeitando minha autonomia durante todo o percurso do trabalho.

À minha co-orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, com quem muito aprendi, cuja competência foi fundamental na minha formação. Um agradecimento especial pela atenção, disponibilidade, carinho e ensinamentos na área de microbiologia.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pelo apoio concedido.

Aos docentes e funcionários do CAUNESP, pelas amizades, ensinamentos valiosos e atenção dispensada no decorrer do curso.

Aos colegas de curso pela amizade, solidariedade e companheirismo neste período, e em especial a Fabiana Bozzo, Fabiana Pilarski, Roberson Sakabe e Camilo Alvarado pelo incomparável espírito de cooperação e amizade, sempre presente e cativante.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a realização da pesquisa.

Ao Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará-UFC, pela acolhida e oportunidade concedida, disponibilizando seus laboratórios, equipamentos e materiais imprescindíveis para a realização dessa pesquisa.

À Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ-RJ, nas pessoas do Dr. Ernesto Hofer, Dr<sup>a</sup> Eliane Moura Falavina dos Reis e toda a equipe do laboratório de enterobactérias pela identificação das cepas de *Salmonella*.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, “as Reginetes” por todos os ensinamentos, auxílio nas dúvidas e amizade que construímos, tornando esse trabalho possível e prazeroso.

Ao amigo Luis (Buda) do Laboratório de Geologia do LABOMAR, pela ajuda na configuração do mapa.

À FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos, Fortaleza-CE, pelos dados meteorológicos concedidos.

À Secretaria de Educação do Estado do Rio Grande do Norte e Secretaria de Educação do Município do Natal-RN, pela concessão da licença para frequentar o curso de doutorado.

Aos amigos “de fora” da vida acadêmica que de uma forma ou de outra participaram desta cruzada, e em especial a Ademilde, minha eterna amiga, que tanto ajudou e torceu pela realização dessa conquista.

À minha família, pelo apoio, compreensão, renúncias e paciência, durante a realização deste trabalho e em especial a minha mana Ritinha por quem tenho orgulho e admiração... Obrigada pela força, solidariedade e incentivos constantes no decorrer de toda minha vida... Você é muito especial!

Ao meu marido Manoel Inácio pela dedicação, incentivo, paciência e companhia durante essa jornada, com tantas mudanças... E ainda pela valiosa colaboração nas longas viagens de coletas, auxiliando nas obtenções das amostras de água nos locais de difícil acesso, o meu muito obrigado.

Aos meus filhos agora adolescentes, Diego e Bruno pelo amor e por terem compartilhado comigo do desafio de viver longe da nossa terra Natal, mas que se enriqueceram também com a experiência vivida.

E em especial a Deus que me conduziu e não permitiu que nada me faltasse em todos os meus dias, me dando saúde, força, coragem e sabedoria para superar os obstáculos e realizar esta conquista.

## SUMÁRIO

<b>Assunto</b>	<b>Página</b>
<b>LISTA DAS TABELAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DAS FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>v</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>01</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 - Área de estudo.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 - Pesquisa de <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 – Teste de antibiograma.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 – Cura plasmidial.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>21</b>
<b>2.6 – Determinação das variáveis ambientais.....</b>	<b>23</b>
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 – Identificação e incidência de <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 - Resistência de <i>Salmonella</i> aos antimicrobianos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 – Parâmetros ambientais e incidência de <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

## LISTA DAS TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1.	Comportamento de <i>Salmonella</i> spp. nas diferentes provas bioquímicas	15
2.	Classes de antibióticos utilizados na pesquisa e seus sítios de ação	18
3.	Identificação das cepas de <i>Salmonella</i> isoladas em amostras de água dos Rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	25
4.	Número de isolados de <i>Salmonella</i> , distribuídos de acordo com o ponto de coleta, nas amostras de água dos rios Acaraú (Cruz - P1, Porto dos barcos pesqueiros - P2 e Mangue - P3) e Jaguaribe (Itaiçaba - P1, Ponte Aracati - P2, Esgoto Compescal - P3 e Fortim - P4) situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	26
5.	Percentual de sensibilidade das cepas de <i>Salmonella</i> spp (n = 103) isoladas de amostras de água do dos Rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	30
6.	Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de <i>Salmonella</i> isoladas de amostras de água do rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	34
7.	Perfil de multi-resistência das cepas de <i>Salmonella</i> isoladas de amostras de água do rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007, frente aos antibióticos testados	35
8.	Resultado do tratamento da cura de plasmídeo das cepas com perfil de resistência isoladas de amostras de água do Rio Jaguaribe-Ceará, no período de novembro/2006	37
9.	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ampicilina, cloranfenicol, ceftriaxona, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, sulfametoxazol e tetraciclina para as cepas de <i>Salmonella</i> isoladas das amostras de água do Rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	39

## LISTA DAS FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Localização dos pontos de coleta, ao norte (Rio Acaraú) e ao sul (Rio Jaguaribe) do Estado do Ceará	13
2.	Esquema para identificação de <i>Salmonella</i> a partir de isolados de amostras de água coletadas em dois ambientes estuarinos do Estado do Ceará (adaptado de WALLACE et al. 2005).	16
3.	Fluxograma do antibiograma realizado de acordo com as normas do NCCLS (2003).	18
4.	Fluxograma do Método da Cura Plasmidial	20
5.	Ilustração da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de diluição em caldo	24
6.	Isolados de <i>Salmonella</i> identificados em amostras de água dos rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007	29
7.	Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de <i>Salmonella</i> spp aos diversos grupos de antimicrobianos	31
8.	Padrão de resistência das cepas de <i>Salmonella</i> spp aos diversos grupos de antimicrobianos	31
9.	Precipitação mensal total (mm) de novembro/06 a maio/07 nos municípios de Acaraú, Aracati, Cruz, Itaiçaba e Fortim (FUNCEME-Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos, Fortaleza-CE	41
10.	Ocorrência de <i>Salmonella</i> nos municípios Acaraú, Cruz, Aracati, Fortim e Itaiçaba no período de novembro/06 a maio/07	42

## SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA PLASMIDIAL DE CEPAS DE *SALMONELLA* SPP ISOLADAS DE DOIS ESTUÁRIOS DO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL

**RESUMO** - A salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais freqüente e considerada uma das zoonoses mais relevantes para a saúde pública em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) assinalou aumento alarmante de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antibióticos devido ao seu uso abusivo em criações intensivas, especialmente nas aquícolas. Diante do exposto, o escopo deste trabalho foi o de isolar e identificar a resistência plasmidial em bactérias do gênero *Salmonella*, em amostras de água de dois ambientes estuarinos, um do Norte (Acaraú) e outro do Sul (Jaguaribe) do Estado do Ceará, ambos com atividades de carcinicultura. Durante sete meses, de novembro de 2006 a maio de 2007, foram coletadas 84 amostras de água dos dois estuários. A pesquisa de *Salmonella* seguiu a metodologia do “Bacteriological Analytical Manual”. As salmonelas foram testadas quanto à susceptibilidade a dez antimicrobianos: Ácido nalidíxico, Ampicilina, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Cloranfenicol, Gentamicina, Imipenem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol e Tetraciclina. A Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos seguiu a técnica de macrodiluição em caldo. Em atividade de base, mediu-se o pH, a temperatura e a salinidade da água. Foram confirmadas 103 cepas de *Salmonella*, 90 no Rio Acaraú e 13 no Rio Jaguaribe, pertencentes aos sorovares: *S. Newport*, *S. Saintpaul*, *S. Panama*, *S. Rubislaw*, *S. Albany*, *S. Anatum*, *S. Corvallis*, *S. Madelia*. O Rio Acaraú apresentou-se mais contaminado do que o Rio Jaguaribe, onde foram encontradas cepas resistentes a antimicrobianos, com um percentual de 25% para resistência plasmidial, e 75% para a cromossômica. Esses resultados ressaltam dois problemas de saúde pública: a presença de cepas de *Salmonella* resistentes e a possibilidade de contaminação humana pelo consumo dos crustáceos. Somado a isso, há de se considerar o prejuízo econômico gerado pela limitação na comercialização do produto no exterior, onde a isenção ou a minimização destes patógenos dos sistemas produtivos e de transformação são exigências do mercado internacional.

**Palavras-chave:** antimicrobianos, carcinicultura, estuários, *Salmonella* sp

## ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND PLASMID RESISTANCE OF SALMONELLA STRAINS IN WATER FROM TWO ESTUARIES IN CEARÁ STATE, BRAZIL

**SUMMARY** - Salmonellosis is one of the most common foodborne diseases, was considered and the most important for public health authorities throughout the world. The World Health Organization (WHO) recently drew attention to the rapid increase in *Salmonella* strains resistant to antibiotics employed in farming activities, especially in aquaculture. Thus, the objective of this study was to test the antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from water samples collected in the estuaries of the Acaraú and Jaguaribe rivers (respectively in the north and south of Ceará State, Brazil), both of which are subject to extensive shrimp farming. Eighty-four samples were collected between November 2006 and May 2007. The susceptibility tests were performed following the guidelines of the Bacteriological Analytical Manual (BAM). The strains were exposed to 10 different antibiotics: nalidixic acid, ampicillin, ciprofloxacin, ceftriaxone, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, nitrofurantoin, sulfamethoxazole and tetracycline. The minimum inhibitory concentration of the antibiotics was determined with the broth macrodilution method. In base activity, measure the factores as Temperature, salinity and pH values were registered for all water samples. One hundred three *Salmonella* strains were isolated (Acaraú n=90; Jaguaribe n=13) belonging to the serotypes *S. Newport*, *S. Saintpaul*, *S. Panama*, *S. Rubislaw*, *S. Albany*, *S. Anatum*, *S. Corvallis* and *S. Madelia*. Thus, the Acaraú river was more severely contaminated than the Jaguaribe river, where strains resistant to antimicrobial were found in a rate of 25% to plasmid resistance and 75% to chromosomal resistance. These results show up two problems of public health: the presence of resistant strains of *Salmonella* and the possibility of human contamination though crustacean consumption. In addition to this, there is to consider the economic damage caused by limiting the marketing of the product abroad where the exempt of these pathogens or minimization of production systems and processing, are requirements of the international market.

**Key words:** antibiotics; shrimp farming; estuaries; *Salmonella* sp.

## 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Salmonella* foi inicialmente caracterizado em 1885, tendo sua denominação em homenagem ao patologista Daniel Salmon. Pertence à família Enterobacteriaceae e é classificada com base em suas características bioquímicas. Apresentam-se como bastonetes curtos (1 a 2 $\mu$ m), Gram-negativos, não esporulados, na maioria móveis por flagelos peritríquios, exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio. Fermenta a glicose, com produção de ácido e gás, sendo incapaz de fermentar a lactose e a sacarose. O pH ótimo para a sua multiplicação fica próximo de 7,0 sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Sua temperatura ideal encontra-se na faixa de 35 a 37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. Com relação à concentração de sal, as *Salmonellas* não toleram concentrações superiores a 9% (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Determinados sorotipos de *Salmonella* apresentam exceções para algumas características comuns do gênero (POPOFF & LE MINOR, 2005).

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o principal reservatório destas bactérias, o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e de sangue frio (JAKABI et al. 1999), exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem contaminar-se após a pesca. Entre os animais, as aves, como as galinhas, os gansos, perus e os patos são os reservatórios mais importantes desse microorganismo. Os animais domésticos ou domiciliarizados tais como cães, gatos, tartarugas e pássaros podem ser portadores, representando grande risco, principalmente para as crianças (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A transmissão da *Salmonella* para o homem geralmente ocorre pelo consumo de água e alimentos contaminados, embora, a transmissão de pessoa para pessoa possa ocorrer, particularmente nos hospitais, ou ainda, através do contato com animais infectados, principalmente entre veterinários e trabalhadores de granjas e fazendas (TRABULSI, 2008). A severidade da doença depende da virulência da cepa e das condições do hospedeiro humano (HOFER et al. 1997).

A excreção da Salmonela através das fezes de humanos e/ou animais, pode contaminar água, solo, outros animais e alimentos. Os animais são infectados pelo contato direto de fezes, água e alimentos contaminados (ARGÔLO FILHO, 2007).

Em função da capacidade de disseminação e de sobrevivência por longo período de tempo no meio ambiente, a salmonela pode ser isolada de águas doces superficiais, da costa marítima e, conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares (JAKABI et al. 1999).

A salmonelose é a doença causada pelas salmonelas e constitui importante problema sócio-econômico em vários países do mundo, principalmente nos chamados em desenvolvimento, onde o agente etiológico desta enfermidade é relatado como o principal responsável pelos surtos das doenças transmitidas por alimentos (ALVES et al. 2001). Das doenças de origem alimentar, é uma das mais freqüentes, e uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em todo o mundo, em razão da elevada endemicidade e, sobretudo, pela dificuldade de controle (ANTUNES et al. 2003, SANTOS et al. 2002). Ela se configura uma toxinfecção de significantes índices de morbidade e mortalidade (CARDOSO et al. 2002).

Os múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos na doença, as inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo dificultam o controle da doença (HOFER et al. 1998).

A vigilância da salmonelose é descrita em todo mundo, especialmente após o aparecimento de cepas multiresistentes a antibióticos, o que dificulta o seu controle e tratamento. A Organização Mundial de Saúde assinalou aumento alarmante de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antibióticos devido ao uso abusivo dos mesmos em criações intensivas (EUROSURVEILLANCE, 1997). Este fato preocupa os órgãos de vigilância e controle ambiental, uma vez que, em animais, o uso de antibióticos nas rações, como promotores do crescimento, contribui para o aparecimento de cepas resistentes e patogênicas (PINTO, 2000). Os antibióticos suprimem a microbiota intestinal normal, rompendo o efeito protetor, aumentando a vantagem competitiva das salmonelas antibiótico resistentes e favorecendo a ocorrência da salmonelose (ELEY, 1994).

Na emergente aquicultura mundial, peixes, camarões e moluscos são criados em tanques escavados, ou em reservatórios de água desprotegidos, expostos à contaminação ambiental de esgotos urbanos, fezes de animais ou alimentos e rações contaminadas. A temperatura alta associada à aquicultura, potencializa a

proliferação e o crescimento da *Salmonella* spp e outros patógenos neste micro ambiente (PIEDRAHITA, 1990). Considerando a prevalência desta bactéria em todos os ambientes de agricultura e sua presença em ambientes aquáticos, estes assumem o papel de importantes veiculadores de zoonoses (D'AOUST, 1994). Esse gênero é responsável por perdas econômicas consideráveis nos plantéis animais e, no homem, é considerado um dos principais agentes etiológicos das enfermidades transmitidas por alimentos (ETA'S) (EKPERIFIN & NAGARAJA, 1998; D'AOUST et al. 2001; POPOFF et al. 2004).

A carcinicultura é uma atividade tradicional que visa à criação racional de camarões em cativeiro. No Brasil, essa atividade teve início na década de 70 e somente a partir da década de 80, com a introdução da espécie exótica, *Litopenaeus vannamei*, ganhou caráter empresarial. Entretanto, evidenciou maior ênfase após 1993 quando a atividade começou a obter êxito e o país adquiriu domínio e auto-suficiência na produção das pós-larvas. No final do século passado, a produção multiplicou-se pelo advento tecnológico de reprodução e engorda do camarão e rações de qualidade que propiciaram a expansão dos empreendimentos interessados no promissor mercado externo (BRASIL, 2004).

O camarão *Litopenaeus vannamei* é uma espécie marinha, oriunda do Oceano Pacífico, com preferência pelo sedimento, vivendo desde a região de infralitoral até profundidades de 72 metros, podendo alcançar 23 cm de comprimento. É a espécie comercial mais explorada no sul do México, Guatemala e El Salvador, e a mais cultivada no Hemisfério Ocidental. Devido a sua importância para a aquicultura e a excelente qualidade da carne (destacando-se seu sabor característico, firmeza e coloração), além da sua grande capacidade de adaptação às mais variadas condições de criação, *Litopenaeus vannamei* se tornou uma espécie bem conhecida e aceita no mercado internacional (BARBIERI JUNIOR & NETO, 2002).

O nordeste brasileiro, devido suas condições naturais favoráveis, detém mais de 96% da produção nacional do camarão marinho de criação. Essa atividade gera empregos envolvendo mão-de-obra especializada e não especializada e bilhões de dólares em renda, sendo uma fonte de produto alimentar de alta qualidade (LIGHTNER et al. 1998). O Ceará, no ano de 2004, foi o segundo maior produtor de

camarão do País, atingindo a cifra de 65 milhões e 18 mil dólares somente com a sua exportação, perdendo somente para o Rio Grande do Norte (EUGÊNIO, 2005).

A crescente demanda do mercado internacional por camarão juntamente com o adensamento das fazendas de criação desse crustáceo nos estuários, e a ocorrência de surtos de doenças que comprometem a produção nas áreas litorâneas, incentivaram o desenvolvimento da carcinicultura em águas interiores (BOAVENTURA et al. 2006).

A criação de camarão apresenta problemas relacionados às questões ambientais, devido ao seu rápido desenvolvimento e altas taxas de estocagem, resultando no surgimento de estresse nos animais e subseqüentemente a incidência de doenças. Muitas fazendas de camarão foram afetadas por epidemias de vírus e vibrioses (CHIU et al. 2007). O principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura mundial consiste atualmente no controle das infecções. As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nas criações, propiciam o rápido alastramento dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades maciças e ocasionando prejuízos econômicos incalculáveis (BARRACO, 2004).

Esse desenvolvimento acelerado nas últimas décadas ocasionou impactos negativos sobre o ambiente, como a conversão de áreas de mangue em viveiros de criação, alterações nos regimes hidrológicos em águas fechadas devido à proliferação de estruturas da atividade de carcinicultura e o descarte de altos níveis de material de origem orgânica nas águas costeiras (PEI-UAN QIAN & WU, 2001).

Diante deste panorama, muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de minimizar a conseqüência negativa do cultivo do camarão sobre o ambiente aquático, buscando na aqüicultura uma produção lucrativa e sustentável que atenda as necessidades de um meio ambiente equilibrado.

As enfermidades causadas por bactérias, protozoários, fungos e vírus são diagnosticadas em camarões de água marinha ou doce em virtude da infectividade destes nos locais de criação (BOAVENTURA et al. 2006; SERRANO, 2005). Assim, a utilização dos antibióticos em doses subterapêuticas nos viveiros tornou-se prática cotidiana entre os produtores. É amplamente reconhecido que o uso intensivo de antibióticos na produção animal contribui para o desenvolvimento de patógenos

antibiótico-resistentes que representam risco tanto para humanos como para animais (WEGENER et al. 1999; WILLIS, 2000). É notória a preocupação no mundo científico no que diz respeito à utilização indiscriminada de antimicrobianos nos sistemas de criação com conseqüente aumento da resistência de bactérias patogênicas, fato observado desde o século passado. Este processo é resultante de seu uso indiscriminado na profilaxia ou terapêutica humana e animal, ou ainda na produção de alimentos. Esse aumento também está ligado à disseminação de plasmídios (moléculas de DNA circulares, de fita dupla e auto-replicativas, menores que os cromossomos) que possuem genes de resistência, proporcionando maior flexibilidade genética em populações microbianas para adaptações e sobrevivência em ambientes hostis (CARDONHA et al. 2005).

Apesar do conhecimento da presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em ambientes de aquicultura, pouco é sabido sobre os efeitos toxicológicos do uso desses antibióticos sobre os organismos não-alvo e o ambiente (WESTON, 1996). O padrão de uso dos antibióticos pelos criadores com a utilização de doses profiláticas sub-terapêuticas, indica que existe alto risco do desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes que representam ameaça para a saúde da população, especialmente para os trabalhadores das fazendas camaroneiras, que além da exposição constante aos antibióticos durante a etapa de mistura da ração, ainda correm riscos de contaminação devido a acidentes durante o trabalho que venham a gerar ferimentos que servem como porta de entrada para bactérias invasivas e multi-resistentes a antibióticos, como a *Salmonella*.

Os antibióticos são classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Os bactericidas provocam alterações incompatíveis com a sobrevivência bacteriana, enquanto os bacteriostáticos inibem o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata (TAVARES, 1996).

O mecanismo de ação dos antibióticos é exercido essencialmente pela interferência na síntese da parede celular, uma vez que ela tem diferente constituição, conforme a bactéria seja Gram-positiva ou Gram-negativa, originando diferenças na permeabilidade às drogas. Os antibióticos que atuam na permeabilidade da membrana citoplasmática assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças à presença em sua molécula, de agrupamentos básicos ( $\text{NH}_3^+$ ) e

de uma cadeia lateral de ácido graxo. A intercalação das moléculas do antibiótico na membrana, provoca desorganização com saída dos componentes celulares e morte da bactéria. Aqueles que atuam interferindo na replicação do DNA formam produtos tóxicos que se intercalam na molécula de DNA, quebrando-a e impedindo a sua síntese; outros relaxam o espiral do DNA, fazendo-o ocupar maior espaço, rompendo a célula bacteriana. Por outro lado, aqueles que agem interferindo na síntese protéica, atuam no nível dos ribossomos inibindo a síntese protéica por diferentes mecanismos (TAVARES, 1996; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antibacterianos (resistência primária), pois somente concentrações inviáveis *in vivo* exerceriam efeito sobre elas. Sob exposição continuada a antimicrobianos, apresentam resistência adquirida (secundária), decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa (FUCHS & WANNMACHER, 1999). Algumas células podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente que podem proporcionar resistência a algum antibiótico (DECAMP & MORIARTY, 2006). Denomina-se resistência simples quando o germe é resistente a uma só droga; resistência múltipla, quando simultaneamente a duas ou mais (TAVARES, 2001).

Para que ocorra a resistência adquirida a antibióticos é necessário ganho ou alteração temporária ou permanente da informação genética bacteriana. A maioria dos genes de resistência está presente em plasmídios, que podem ser trocados com elementos cromossomiais. A resistência a antibióticos pode ser realizada por três mecanismos principais (STROHL et al. 2004): diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antibiótico; alteração do sítio-alvo do antibiótico e obtenção da habilidade de destruir ou modificar o antibiótico.

A resistência adquirida ocorre por mutações no cromossoma bacteriano (o que origina o surgimento de genes de resistência numa bactéria sensível) ou pela transferência de genes de resistência de uma célula para outra, através da inserção na célula receptora de fragmentos de DNA contendo estes genes. As duas modalidades de resistência, a mutação (cromossômica) e a transferível (plasmidial), podem estar presentes na mesma bactéria (TAVARES, 2001).

Os plasmídios são moléculas extracromossomais circulares de DNA encontradas em muitas espécies bacterianas e em algumas espécies de eucariotos.

Eles se replicam separadamente ou junto com a célula hospedeira, passando às células-filhas. Os plasmídios podem ser curados ou removidos da célula, depois de serem submetidos a diferentes condições de estresse, como mudanças na temperatura, presença de certos corantes ou carência de certos nutrientes. Eles não são indispensáveis à célula, mas podem conferir-lhe vantagens seletivas: possui informação para degradação de certos substratos, resistência a um antibiótico ou a um metal pesado. Os plasmídios são capazes de autoduplicação independente da replicação cromossômica e podem existir em número variável. São exemplos de plasmídios: fatores sexuais (fator – F), fatores de resistência a antibióticos (fator – R), plasmídio de fixação de N<sub>2</sub> (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Em 122 cepas de *Salmonella* isoladas de diferentes fontes e regiões do Brasil, foram detectados plasmídios de resistência à tetraciclina e cloranfenicol, com maior incidência em *S. Panama*, *S. Saintpaul* e *S. Mbandaka* de origem animal, alimentar e ambiental (COSTA et al. 2006).

Agentes antimicrobianos são adotados de forma essencial para cuidados com a saúde humana e animal. São usados em diferentes ambientes e com diferentes propósitos para prevenir ou curar, fato que promove o surgimento de cepas com múltipla resistência a agentes microbianos, caracterizando um problema de saúde pública (FAO/OIE/WHO, 2006) especialmente no tratamento de infecções invasivas. No passado, a ampicilina, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetropim eram considerados como "tratamento de escolha" para infecções provocadas por *Salmonella* (MCDONALD et al. 1987; RILEY et al. 1984; LEE et al. 1994), o que hoje não se observa devido à resistência adquirida a estes antimicrobianos. A resistência em bacilos Gram negativos entéricos, é mediada principalmente por plasmídios (TENOVER, 2001).

O ambiente aquícola é importante meio para a seleção de espécies bacterianas resistentes a vários antimicrobianos (SCHMIDT et al. 2000). Além do mais, o contato físico entre as bactérias no meio aquático possibilita uma alta frequência de troca de elementos genéticos móveis, como plasmídios e transposons, codificadores de resistência aos antibióticos. Eventos como esses são particularmente importantes para difusão de resistência às drogas (RHODES et al. 2000).

Microrganismos podem se mover facilmente entre os ecossistemas de seres humanos e animais para o solo e a água e vice-versa. Dessa forma, genes resistentes adquiridos por organismos num ecossistema podem ser facilmente transferidos entre organismos em diferentes ecossistemas (NWOSU, 2001).

O surgimento da resistência antimicrobiana em espécies de *Salmonella* não-tifóide caracteriza sério problema de saúde pública ao redor do mundo. A alta taxa de resistência ocorre devido ao uso convencional de antibióticos, principalmente em criações extensivas, que embora seja a maneira mais rápida de responder a uma doença, podem causar um aumento na virulência dos patógenos (CARVALHO et al. 2006).

Na região Nordeste do Brasil, foi detectada a presença de *Salmonella* nos ambientes de fazendas de carcinicultura costeira e nas águas dos rios da referida região (CARVALHO, 2006; FIGUEIREDO et al. 2005; PARENTE, 2005; VIEIRA et al. 2003). Sua presença está relacionada principalmente aos despejos de efluentes sanitários sem tratamento nos corpos aquáticos, situação comumente encontrada no Estado do Ceará que influi na qualidade do camarão cultivado, representando risco para a saúde pública da população em geral.

A presença de *Salmonella*, em amostras de sedimento, água e camarão, ocorre pelo fato dela sobreviver bem no sedimento, sendo transferido posteriormente para água e para o animal (BHASKAR et al. 1995).

Bactérias do gênero *Salmonella* foram isoladas em amostras de água e peixes em sistema de consórcio suíno-piscicultura da região metropolitana de Belo Horizonte-MG. Das 97 amostras analisadas, apenas uma (0,97%) coletada na drenagem do viveiro da propriedade apresentou *Salmonella* spp. Nesta propriedade, foi observada a presença de aves e suas fezes nos sacos de rações, além de outros animais na fazenda, da qual foi isolada a amostra (MURATORI, 2000).

A ocorrência de *Salmonella* nas águas dos rios cearenses Choró, Coreaú, Jaguaribe e Acaraú foi verificada em 13 isolados no período intermediário, seis no período seco e nove no chuvoso (MENEZES et al. 2006).

A distribuição de *Salmonella* em águas costeiras na região da Galicia ao norte da Espanha, demonstrou que o isolamento deste microrganismo era sazonal, com a maior detecção ocorrendo no período do verão (MARTINEZ-URTAZA et al. 2004).

Por outro lado, em águas fluviais cearenses, percentuais de sorotipos foram também isolados no período chuvoso (24%), provavelmente pelo aporte de matéria orgânica que os rios recebem nesse período (CARVALHO, 2006).

As salmonelas são disseminadas para ambientes aquáticos por diversas fontes, incluindo descarga de efluentes das indústrias de exploração animal e agrícola, além da excreção de animais. Assim, bactérias alóctones e vários outros microrganismos entéricos presentes no ambiente, estão diretamente relacionados com a descarga de resíduos para os rios e áreas costeiras (MURRAY, 2000; BARCINA et al. 1997).

Pesquisas em esgotos brutos de vários países mostraram concentrações para *Salmonella* em torno de 250 UFC/100mL na Índia, de 8.000 UFC/100mL em Houston (Texas) e de até 7.240 UFC/100mL no Reino Unido (FEACHEM et al. 1983). No Brasil, estudos mostraram altas freqüências de isolamento de *Salmonella* nos esgotos de São Paulo e em águas fluviais do mesmo estado, impactadas com águas residuárias (MARTINS, 1979; MARTINS et al. 1986; TAVECHIO et al. 1996; FARIAS, 2000). Nos estados do Ceará e do Pará, trabalhos mostram um quadro semelhante de alta contaminação de águas superficiais marinhas e de esgoto (MELO et al. 1997; LOUREIRO, 1990).

Os esgotos são excelentes fontes de transmissão de *Salmonella*, entre outros enteropatógenos (MARTINS, 1979; MELO et al. 1997). A alta prevalência de *Salmonella* em águas contaminadas com esgotos nos países da América Latina, destacando o Brasil em particular, torna importante o monitoramento desta bactéria em águas superficiais, a fim de associar sua presença com a contaminação ambiental, bem como, a de peixes, camarões e mariscos. Informações epidemiológicas sobre a prevalência e a diversidade dos sorotipos de *Salmonella* na superfície da água são essenciais para o controle da doença. Estas bactérias são constantemente encontradas em amostras ambientais, por causa dos excretos humanos e de animais. Esgotos municipais e águas correntes de tempestade são as principais fontes deste patógeno em águas naturais. A capacidade de sobrevivência das cepas ambientais depende da espécie e fonte de poluição. O mapeamento da carga bacteriana e sua distribuição ambiental em rios e áreas costeiras são muito importantes para estudos na área de saúde pública (ARVANITIDOU et al. 2005).

Desta forma, os estudos da qualidade das águas na região Nordeste do Brasil, e a busca de enteropatógenos no ambiente hídrico são importantes para a tomada de decisões de cunho ambiental e de saúde pública, já que estas águas são de usos múltiplos e irrestritos.

A circulação dos sorotipos oriundos de humanos para ambiente e vice-versa, foi constatada na identificação de 411 isolados de *Salmonella* de indivíduos residentes em diferentes áreas da região amazônica, e os isolados de animais silvestres típicos da região amazônica e da água do esgoto, principalmente no Município de Belém/Pará (LOUREIRO, 1990). Foram identificadas 68 sorovares de *Salmonella* nas amostras de origem da infecção humana, dentre os quais prevaleceram os sorotipos *S. Typhi*, *S. Give*, *S. Thyphimurium*, *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Miami*, *S. Newport*, *S. Saintpaul*, *S. Panamá*, *S. Infantis* e *S. Grumpensis*.

Em amostras de água de esgoto no Rio de Janeiro, *S. Agona* foi um dos sorovares mais freqüentes (CÂMARA et al. 1982), e no Belém no Pará *S. Agona*, *S. Hadar* e *S. Infantis*, foram as mais freqüentes (FARIAS et al. 1997).

De amostras de água de 113 bebedouros de animais em propriedades rurais do município de Botucatu-SP, foi isolada *Salmonella* em águas de 15 bebedouros (SOUZA et al. 1992). Entre os oito sorovares identificados, os mais presentes foram *S. Dublin* (20%), *S. Newport* (13,3%) e *S. Madelia* (13,3%).

Por outro lado, em amostras de água marinha do litoral sul de São Paulo foram identificados os seguintes sorovares: *S. Sandiego*, *S. Houtenae* e *S. Rubislaw* (RISTORI, 2000).

Países desenvolvidos, como os membros da NAFTA (EUA, Canadá e México) e os países da União Européia, responsáveis pela compra de grande parte do camarão brasileiro, passaram a exigir qualidade microbiológica muito superior, especialmente com relação à presença de Salmonelas. Para que os produtos de origem alimentar sejam considerados aptos para consumo humano, esse microrganismo deve estar ausente em 25g de amostra de alimento analisado (PERESI et al. 1998; SANTOS et al. 2003); atendendo assim a demanda crescente por produtos de alta qualidade, onde os sistemas produtivos e de transformação deverão ser desenhados e gerenciados, utilizando-se áreas livres de conflitos sociais

e riscos ambientais, visando principalmente, a exclusão ou a minimização de patógenos (MAIA, 2004).

A escassez de dados quantitativos da maioria dos países envolvidos com a aqüicultura, torna a avaliação dos riscos associados com o uso de drogas químicas uma tarefa difícil. Assim, as informações disponíveis sobre sua eficácia, metabolização, tempo de residência no tecido dos organismos cultivados e ação sobre o meio ambiente estão restritas a regiões de climas temperados. Tais informações, porém, podem não se confirmar em climas tropicais, onde a temperatura, o tipo de solo, a água e as espécies de criação apresentam diferentes características (NOGUEIRA-LIMA et al. 2006).

Poucos estudos têm caracterizado a ocorrência de resistência a bactérias em ambientes aqüícolas, particularmente em climas tropicais. Diante do exposto, o escopo deste trabalho foi o de isolar e identificar a resistência plasmidial em bactérias do gênero *Salmonella*, em amostras de água de dois ambientes estuarinos (um do Norte e outro do Sul do Estado do Ceará), ambos com atividades de carcinicultura.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Área de estudo

As coletas foram realizadas em dois estuários no Estado do Ceará: Acaraú e Jaguaribe, situados respectivamente ao norte e sul do Estado (Figura 1). De cada estuário foram escolhidos, três e quatro pontos de coletas respectivamente. O primeiro deles, o “controle”, situado antes da cidade, onde não havia influência antropogênica; o segundo logo após a cidade, o terceiro próximo a uma carcinicultura e o último perto do mar onde o rio deságua.

As coordenadas geográficas de cada ponto de coleta previamente escolhido foram registradas por um GPS da marca Garmin III Plus; sendo as seguintes: Acaraú – P1: Controle: 2° 55' 08.8" S; 40° 08' 45.5" W; Acaraú – P2: 2° 55' 10.1" S; 40° 08' 45.4" W; Acaraú – P3: 2° 53' 00.9" S; 40° 07' 27.2" W. Jaguaribe – P1/Controle: 4° 40' 18,2"; 37° 48' 48"; Jaguaribe – P2: 4° 34' 32,4"; 37° 47' 16,3"; Jaguaribe - P3: 4° 33' 10,8"; 37° 48' 23,1"; Jaguaribe - P4: 4° 25' 34,1"; 37° 46' 28,3".

Foram coletadas, respectivamente, 36 e 48 amostras de água dos estuários Acaraú e Jaguaribe, com frequência quinzenal, perfazendo um total de 84 amostras. As coletas foram realizadas em dois períodos sazonais: seco e chuvoso, durante o período de novembro/2006 a maio/2007.

As amostras de água, de cada ponto de coleta, foram coletadas em duplicata, utilizando-se garrafas de vidros âmbar, com capacidade de 1000 mL (Figura 2). Coletou-se a água de uma profundidade de aproximadamente 30 cm da superfície. Em seguida, essas amostras foram filtradas através de gazes medindo 2,5 m, dobradas e inseridas no interior de cestas de garrafas PET, contendo furos em toda sua extensão. Posteriormente, as gazes foram imersas em 225mL de Caldo Lactosado (CL) e ao término de cada coleta, foram transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de microbiologia ambiental e do pescado no Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR/UFC, para serem processadas e submetidas à análise microbiológica. A pesquisa de *Salmonella* seguiu a metodologia do Bacteriological Analytical Manual (WALLACE et al. 2005).

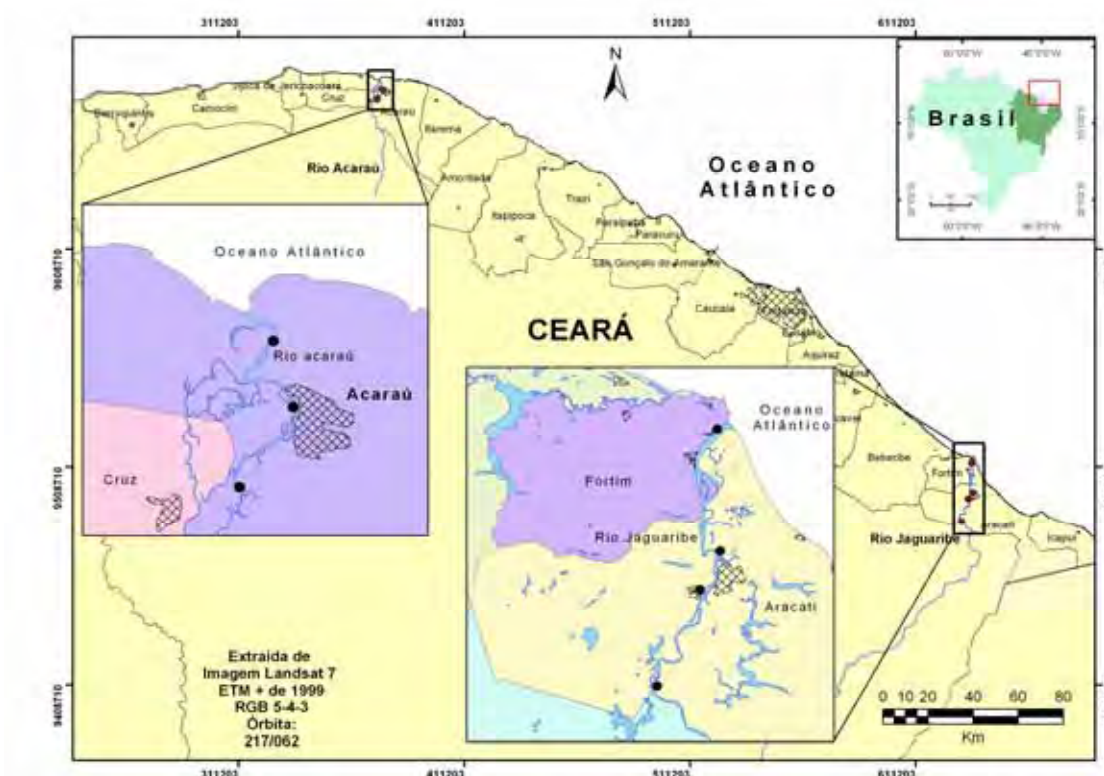


Figura 1 - Localização dos pontos de coleta, ao norte (Rio Acaraú) e ao sul (Rio Jaguaribe) do Estado do Ceará.

## 2.2 - Pesquisa de *Salmonella*

### 2.2.1 - Pré-enriquecimento das amostras

Em laboratório, as amostras imersas em Caldo Lactosado (meio não seletivo para restaurar salmonelas injuriadas, a uma condição fisiológica estável), foram incubadas por 24 horas em estufa a 35-37<sup>o</sup> C.

### 2.2.2 - Meio de enriquecimento

Após o período de 24 horas de incubação das amostras em CL, foram retiradas alíquotas de 1mL e 0,1mL e inoculadas em 10mL de caldo Tetrionato (TT) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), respectivamente. Os tubos foram incubados por 24 horas, à temperatura de 37°C e 42-43°C, em banho-maria. A partir do crescimento microbiano em ambos os tubos, foram retiradas alíquotas de cada meio com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e estriadas em três placas de Petri contendo os meios seletivos ágar Hektoen (Difco), ágar MacConkey (Difco) e ágar verde

brilhante. Estas foram então incubadas por 24 horas a 35-37°C. Em seguida, observou-se em cada placa, a morfologia das colônias nos meios MacConkey (colônias brancas-leitosas), Hektoen (colônias verdes, com halo e ponto negro no centro), ágar verde brilhante (colônias vermelhas).

### 2.2.3 - Plaqueamento diferencial, testes preliminares e sorologia

Foram isoladas cinco colônias características de *Salmonella* de cada placa de ágar seletivo as quais foram então inoculadas em ágar ferro açúcar triplo (TSI) (Difco), ágar lisina ferro (LIA) (Difco), ágar sulfeto-indol-motilidade (SIM) (Difco), caldo malonato e caldo uréia e incubadas por 24 horas a 35-37°C. A partir do crescimento positivo nos tubos (ácido na base e alcalino no ápice para o meio ágar TSI, alcalino com ou sem produção de H<sub>2</sub>S para o meio ágar LIA, produção de indol observada pela formação de um anel vermelho sobre a superfície do meio ágar SIM, permanência das cores originais verde e amarelo dos meios malonato e uréia, respectivamente), uma nova alíquota foi retirada e semeada em ágar triptonsoja (TSA) (Difco), para a posterior realização do teste de sorologia.

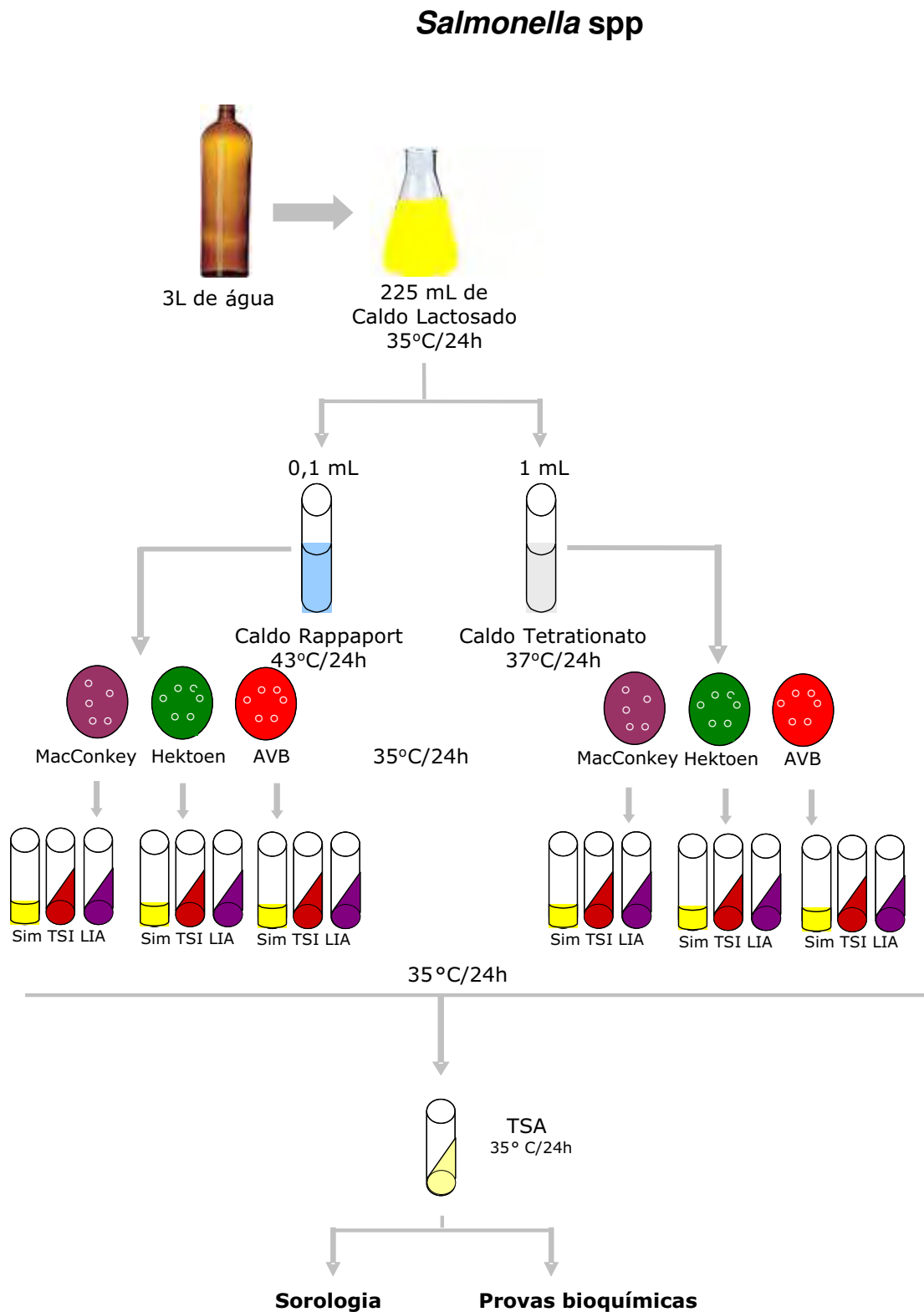
No teste de sorologia, semeou-se a cepa isolada em TSA inclinado e incubou-se a 37°C por 18-24 horas. Em seguida, preparou-se a suspensão bacteriana, adicionando 1 a 2 mL de solução salina (0,85%) nos tubos de TSA (24 h), homogeneizando a suspensão levemente nas mãos. Em uma lâmina de vidro esterilizada, adicionou-se em cada quadrante, uma gota (10 µl) de antissoro polivalente, seguida por uma de suspensão bacteriana, homogeneizando com o auxílio de uma alça de níquel-cromo esterilizada. Foram impelidos movimentos rotatórios, ao mesmo tempo em que foi observado por um minuto, em caixa de Huddleson, a presença de aglutinação (grumos finos – somática e grumos espessos – aglutinação flagelar). As cepas que aglutinavam no anti-soro O:H polivalente, eram consideradas positivas para *Salmonella*, sendo posteriormente submetidas as provas bioquímicas.

### 2.2.4 – Caracterização bioquímica complementar

A identificação de membros da família Enterobacteriaceae requer a utilização de provas bioquímicas complementares, as quais permitem avaliar as características metabólicas e identificar os gêneros e/ou as espécies. Os isolados positivos foram submetidos às provas bioquímicas descritas na tabela 1 e identificados para confirmação e caracterização das espécies, seguindo esquema sugerido pelo Laboratório de Referencia Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas - LRNCEB/LABENT – IOC - (2006). Em seguida, foram separadas e encaminhadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ–RJ, para a identificação dos sorovares (Figura 2).

**Tabela 1** – Comportamento de *Salmonella* spp. nas diferentes provas bioquímicas

Meios	Reações	Reação (+) ou (-)
TSI	Reação ácida e gás na profundidade. Superfície alcalina (vermelha). Presença de H <sub>2</sub> S.	+
LIA	Base e ápice cor púrpura, presença ou ausência de H <sub>2</sub> S.	+
SIM (Indol)	Anel amarelo após colocação do reagente - Kovacs	-
SIM (H <sub>2</sub> S)	Pigmento negro de qualquer intensidade ou somente na picada (cepas imóveis).	+
SIM (Motilidade)	Crescimento ao longo da picada (imóvel) ou turvação do meio (móvel).	+
Costa & Vernin (CV)	Meio inalterado, com certa alcalinidade no ápice (esverdeado ou azulado). Presença ou ausência de H <sub>2</sub> S na interfase sólida/semi-sólida; ausência de gás; móvel ou imóvel.	-
Uréia	Não há viragem do pH	-
Malonato	Não há alteração da cor verde do meio	-
Citrato Simmons	Reação alcalina: cor azul do meio	+
Vermelho de Metila	Coloração vermelha do meio após adição do reagente	+
Voges Proskauer	Meio sem alteração após adição dos reagentes	-



**Figura 2** - Fluxograma para identificação de *Salmonella* a partir de isolados de amostras de água coletadas em dois ambientes estuarinos do Estado do Ceará (adaptado de WALLACE et al. 2005).

### 2.3 – Teste do Antibiograma

As cepas confirmadas e identificadas como *Salmonella*, foram testadas quanto à susceptibilidade a 10 antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação (Tabela 1): Ácido nalidíxico – NAL (30 µg), Ampicilina – AMP (10 µg), Ciprofloxacina – CIP (5 µg), Ceftriazona – CRO (30 µg), Cloranfenicol – CLO (30 µg), Gentamicina – GEN (10 µg), Imipenem – IPM (10 µg), Nitrofurantoína – NIT (300 µg), Sulfametoxazol – SUT (25 µg) e Tetraciclina – TET (30 µg), por meio do antibiograma, pelo método de difusão em discos, conforme as normas do documento M2–A8, do National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS (2003b), sumarizado a seguir (Figura 3). *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella anatum* IOC 4279-99 foram utilizadas como controle de referência.

Foi preparado um inóculo a partir do crescimento bacteriano em meio Ágar TSA e transferida uma alçada para salina esterilizada a 0,85% até que se alcançasse uma suspensão comparável à turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para essa comparação foi utilizado um aparelho fotométrico, modelo Micronal B542, em absorvância de 625 nm. O limite de leitura aceitável variou entre 0,08 e 0,10; quando o inóculo inicial não ficou dentro do limite aceitável, a turbidez foi ajustada com mais bactéria ou mais salina estéril conforme a necessidade. Em placa de petri contendo Ágar Mueller-Hinton numa espessura de 4 mm, o inóculo foi espalhado uniformemente com o auxílio de uma zaragatoa estéril, de modo a cobrir homogeneamente toda a superfície da placa. Foram utilizados discos impregnados com os antibióticos escolhidos; todos fabricados pela Laborclin® e adquiridos comercialmente da empresa Interlab. Estes discos foram aplicados no meio inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados, levemente, sob a superfície do meio.

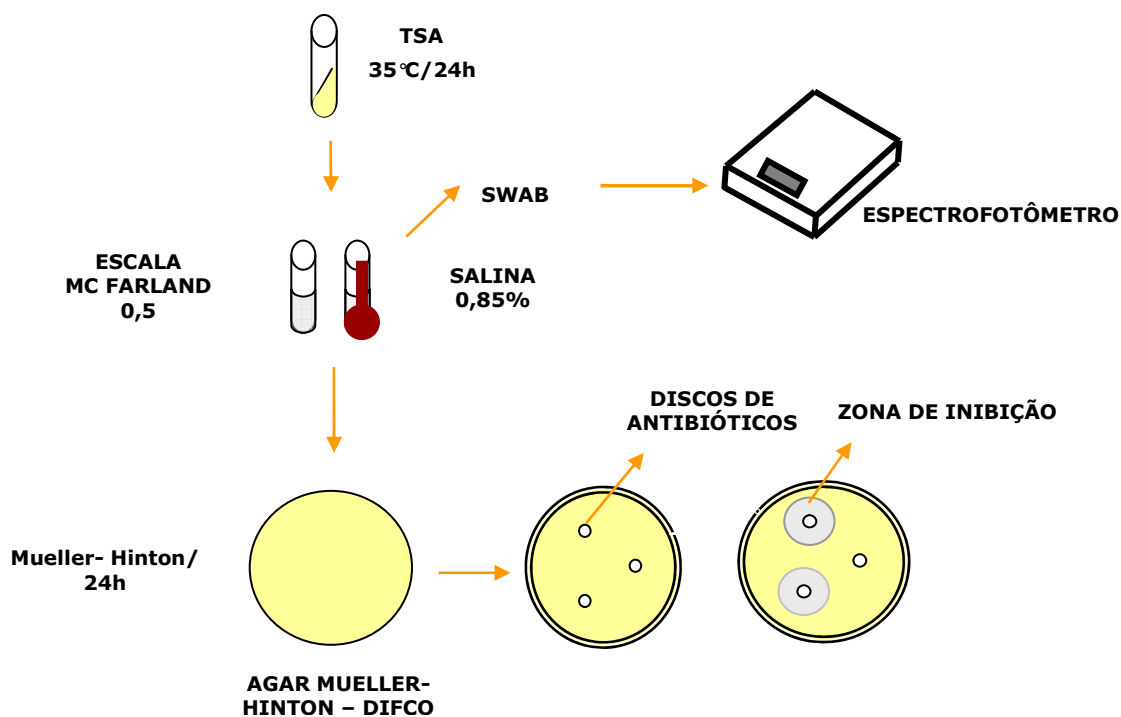
Após a secagem, por um período máximo de 15 minutos, as placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C por 24h. A leitura do antibiograma foi realizada com auxílio de um paquímetro, a partir da medição em milímetros, do diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias, frente ao antibiótico impregnado em cada disco. Os resultados obtidos foram comparados com os da tabela padrão, que contém os parâmetros da Tabela 2A, do documento M100-S17 (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2007b). Esses resultados

também foram interpretados pela tabela fornecida pelo fabricante (Laborclin)®. Ambas as tabelas apresentam os mesmos valores, o que permitiu a classificação das cepas em sensíveis, intermediárias ou resistentes para cada antibiótico testado.

**Tabela 2** - Classes de antibióticos utilizados na pesquisa e seus sítios de ação.

Classes	Antibiótico	Sítio de Ação
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10µg (GEN)	Biossíntese de proteínas
Cloranfenicol	Cloranfenicol 25µg (CLO)	Biossíntese de proteínas
Tetraciclina	Tetraciclina 30µg (TET)	Biossíntese de proteínas
Aminopenicilina	Ampicilina 10µg (AMP)	Biossíntese da parede bacteriana
Cefalosporinas	Ceftriaxona 30µg (CRO)	Biossíntese da parede bacteriana
Carbapenemas	Imipenem 10µg (IPM)	Biossíntese da parede bacteriana
Quinolonas	Ácido Nalidíxico 30µg (NAL)	Biossíntese de ácidos nucleicos
	Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	Biossíntese de ácidos nucleicos
Sulfonamidas	Sulfametoxazol 25µg (SUT)	Biossíntese do ácido fólico
Nitrofuranos	Nitrofurantoína 300µg (NIT)	Redução enzimática

Fonte: CEFAR, 2006.



**Figura 3** - Fluxograma do antibiograma realizado de acordo com as normas do NCCLS (2003).

## **2.4 – Cura Plasmidial**

As cepas submetidas ao teste de antibiograma que apresentaram perfil de resistência a determinados antibióticos foram submetidas à cura plasmidial, realizada de acordo com MOLINA-AJA et al. (2002). Esta técnica consiste na extração do plasmídeo de resistência da bactéria, tornando-a sensível a determinado antibiótico.

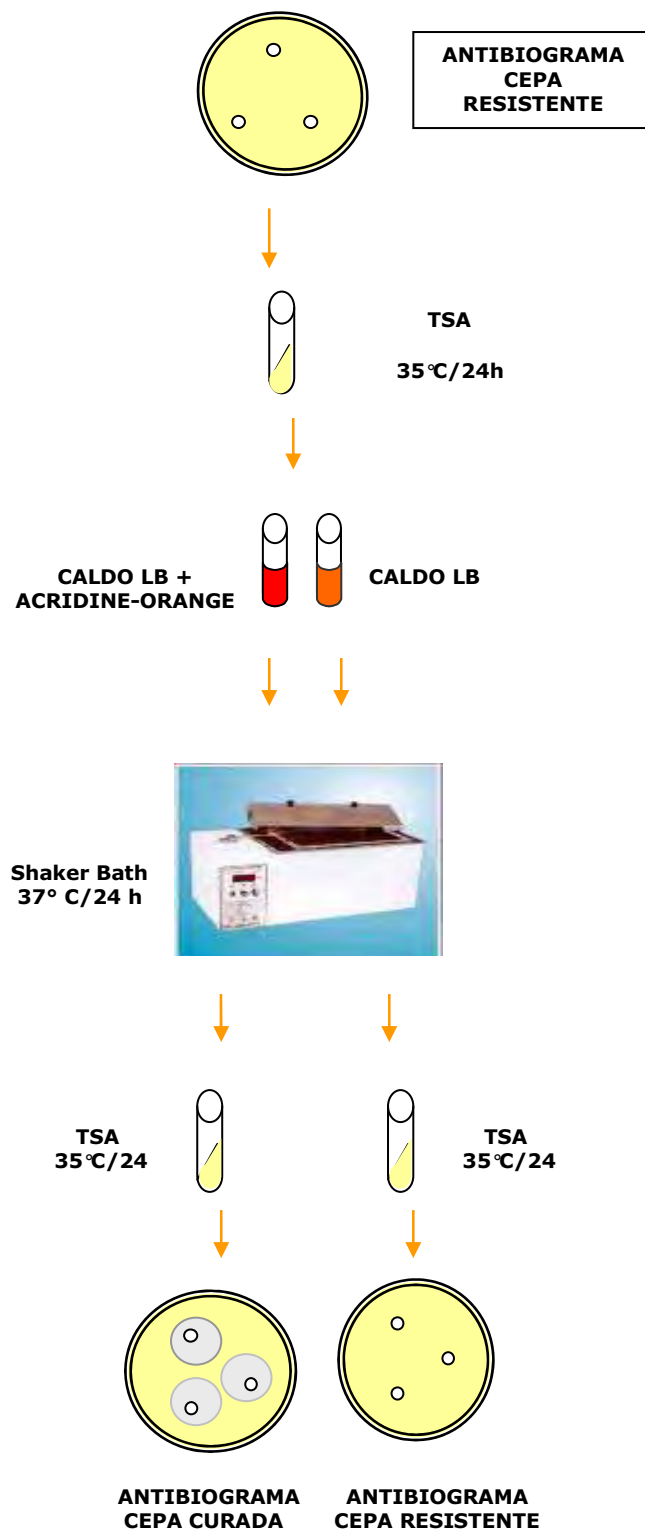
### **2.4.1 - Preparo do Meio de Cultura**

Preparou-se o caldo LB (Luria Bertani) com a seguinte composição: 0,5g de tripton, 0,25g de extrato de levedura, 0,25g de NaCl, para 50mL de água destilada; em seguida foi suplementado com 0,0050g do corante “acridine-orange” e esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

### **2.4.2 – Procedimento**

O procedimento da cura plasmidial seguiu as seguintes etapas:

- Após o crescimento bacteriano em meio Ágar TSA, adicionou-se aos tubos 5mL de caldo LB (Luria Bertani) suplementado com acridine-orange;
- Fez-se o controle das culturas (que devem apresentar perfil de resistência após a repetição do antibiograma, pela presença do plasmídeo) utilizando-se um tubo com 5mL de caldo LB sem adição de acridine-orange.
- Os tubos foram incubados em shaker bath marca Orbit® da Lab-line (banho-maria com agitação) a 37 °C por 24h;
- Após esse período, inoculou-se em TSA e incubou-se em estufa a 37°C por 24h. Os isolados foram testados novamente com o antibiograma, para detectar quais cepas perderam o plasmídeo (Figura 4).



**Figura 4** - Fluxograma do Método da Cura Plasmidial.

## **2.5 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM**

A determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos para os quais as cepas se mostraram sensíveis foi realizada, segundo a técnica de macrodiluição em caldo, de acordo com a metodologia do documento M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS (2003a).

### **2.5.1 – Preparo do Meio de Cultura**

Caldo Mueller Hinton (MH) foi preparado em Erlenmeyer, na quantidade necessária para ser distribuída nos tubos que somaram um volume de 5mL do meio e da solução estoque (considerando 1 tubo para cada concentração). O caldo MH foi preparado na proporção de 21g do Agar desidratado em 1000mL de água destilada, sendo ajustado para 7,2 a 7,4 o pH do meio e em seguida, esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

### **2.5.2 – Preparo das Soluções estoques**

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima, foram preparadas soluções estoques para uma quantidade equivalente a 25mL, compostas por determinado antibiótico em pó (matéria-prima) dissolvido em seu solvente e diluente específicos, conforme a tabela 04 do CLSI, (2005a). Os antibióticos foram pesados em uma balança analítica da marca Tecnal®, modelo B-TEC-210-A. Os antibióticos em pó foram adquiridos comercialmente em diversas empresas farmacêuticas e hospitalares. O Sulfametoxazol foi doado pela Gerbras Química Farmacêutica Ltda. Foram preparadas as seguintes soluções:

- Acido Nalidíxico (Henrifarma): foi preparada uma solução com ½ volume de água (12,5 mL) com o antibiótico em pó. Em seguida, foi adicionado NaOH (Hidróxido de sódio) 1 mol/L, gotejando para dissolver o antibiótico, para finalmente completar o volume para 25 mL com água destilada esterilizada.
- Ampicilina (250mg/EMS): foi preparado em tampão fosfato a 0,1 mol/L, pH 8,0 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Fosfato de potássio monobásico (0,121g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Fosfato de potássio dibásico (0,34g), NaCl, Cloreto de sódio (0,8g) para um volume de 100 mL de água destilada. A solução tampão foi esterilizada a 121 °C por 15 minutos.
- Ceftriaxona (250 mg/Sigma): foi preparado em água destilada e esterilizada.

- Cloranfenicol (Genix): foi preparado adicionando-se uma pequena quantidade de etanol a 95% como solvente, utilizando-se como diluente, água destilada esterilizada para um volume de 25mL.
- Sulfametoxazol (Virchow): foi preparada uma solução com ½ volume de água (12,5 mL) com o antibiótico em pó. Em seguida, foi gotejado NaOH (Hidróxido de sódio) 2,5 mol/L, para dissolver o antibiótico e finalmente foi completado o volume para 25 mL com água destilada esterilizada.
- Tetraciclina (Galena): foi preparada uma solução de tetraciclina, utilizando-se como solvente água destilada esterilizada.

### 2.5.3 – Cálculo do Volume da Solução Estoque

**Fórmula:  $C1 \times V1 = C2 \times V2$**

$$V1 = C2 \times V2 \div C1$$

C1 = Concentração 10 X maior de antibiótico.

V1 = Volume da solução estoque adicionado ao tubo com caldo MH.

C2 = Concentração do antibiótico a ser testada.

V2 = Volume do caldo MH no tubo de ensaio

### 2.5.4 – Cálculo do Peso do Antibiótico

Os antibióticos foram pesados em uma balança analítica da marca Tecnal®, modelo B-TEC-210-A. Os antibióticos em pó foram adquiridos comercialmente em diversas empresas farmacêuticas e hospitalares. O Sulfametoxazol foi doado pela Gerbras Química Farmacêutica Ltda.

#### **Peso do antibiótico:**

Concentração de 400 µg

400 µg ----- 0,4 mg ----- 100 mL

x ----- 25 mL (volume da solução estoque)

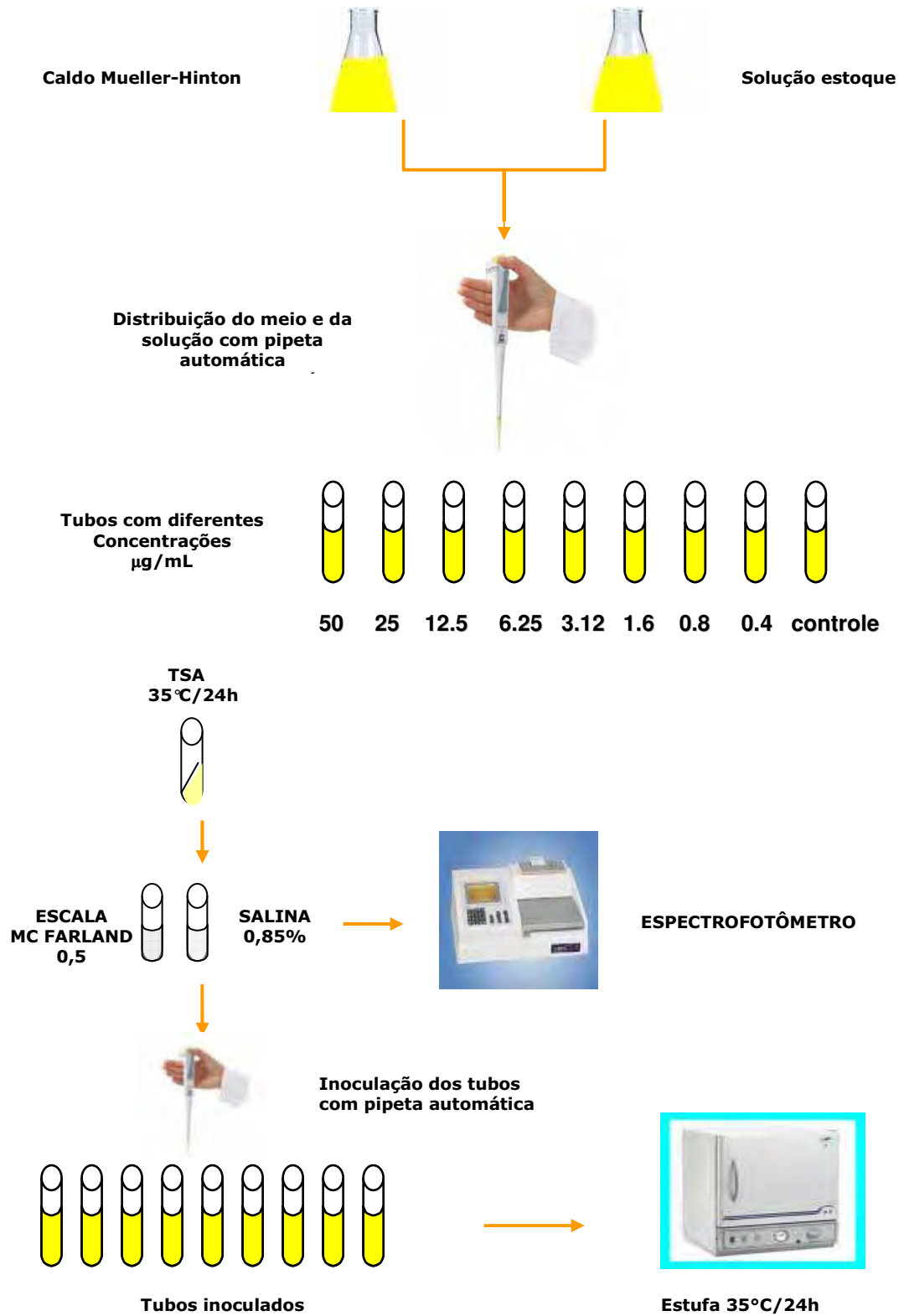
x = 0,1 mg (peso do antibiótico)

### **2.5.5 – Procedimento**

Primeiramente, cada antibiótico foi testado em diferentes concentrações num intervalo de 10 em 10, iniciando-se numa concentração imediatamente superior àquela do disco. Portanto, para um determinado antibiótico cuja concentração do disco era igual a 10µg, foram testadas as concentrações 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100µg, utilizando-se um tubo de ensaio para cada concentração e um tubo controle (sem adição da solução estoque). De acordo com o resultado obtido, testou-se novamente cada antibiótico em intervalos menores (5 – 5) ou maiores (50 – 50). Determinou-se, então, a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos (Figura 5).

### **2.6 - Determinação das Variáveis Ambientais**

Foram analisados os parâmetros físico-químicos da água, como pH, temperatura e salinidade. A temperatura e salinidade da água foram determinadas no momento das coletas utilizando, respectivamente, termômetro e refratômetro portátil (ATAGO S/MILL). Em laboratório, foi determinado o pH das amostras de água, através de um potenciômetro (MARCONI-PA200P).



**Figura 5** - Ilustração da determinação da Concentração Inibitória Mínima(CIM) pelo método de diluição em caldo.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Identificação e Incidência de *Salmonella*

No período de estudo, 1.011 cepas suspeitas de *Salmonella* spp foram isoladas das amostras de água coletadas dos rios Acaraú e Jaguaribe. Dentre essas, foram confirmadas como *Salmonella*, 103 cepas, sendo 90 (87,38%) isoladas de amostras de água do Rio Acaraú e 13 (12,62%) do Rio Jaguaribe. A Tabela 3 mostra o número de isolados de *Salmonella* identificados em cada ponto de coleta, nas amostras de água dos dois rios.

**Tabela 3** – Identificação das cepas de *Salmonella* isoladas em amostras de água dos Rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Sorovares	Rio Acaraú	Rio Jaguaribe	Total
<i>Salmonella</i> Albany	-	3	3
<i>Salmonella</i> Anatum	8	3	11
<i>Salmonella</i> Corvallis	1	-	1
<i>Salmonella</i> Enterica	3	1	4
<i>Salmonella</i> Madelia	4	-	4
<i>Salmonella</i> Newport	29	2	31
<i>Salmonella</i> Panamá	25	-	25
<i>Salmonella</i> Rubislaw	5	1	6
<i>Salmonella</i> Saintpaul	15	3	18
<b>Total de cepas</b>	<b>90 (87,38%)</b>	<b>13 (12,62%)</b>	<b>103</b>

A Tabela 4 mostra o número de isolados de *Salmonella* de cada ponto de coleta, nas amostras de água dos rios Acaraú e Jaguaribe. A maior incidência de *Salmonella* ocorreu nas amostras de água coletadas no ponto 1 (controle) do rio Acaraú (55,55%), seguida do ponto 2 desse mesmo rio (37,77%). Ambos os pontos somaram 93,32% do percentual total de incidência (Tabela 4).

**Tabela 4** - Número de isolados de *Salmonella*, distribuídos de acordo com os diferentes pontos de coleta, nas amostras de água dos rios Acaraú e Jaguaribe situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Coletas	Acaraú			Total	Jaguaribe				Total	Total de isolados dos dois rios
	P1	P2	P3		P1	P2	P3	P4		
1 <sup>a</sup> (nov/06)	9	7	-	16	-	-	-	-	-	16
2 <sup>a</sup> (nov/06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 <sup>a</sup> (dez/06)	2	8	1	11	1	3	1	2	7	18
4 <sup>a</sup> (jan/07)	16	6	-	22	-	-	-	1	1	23
5 <sup>a</sup> (jan/07)	3	-	-	3	-	-	-	-	-	3
6 <sup>a</sup> (fev/07)	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
7 <sup>a</sup> (fev/07)	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1
8 <sup>a</sup> (mar/07)	1	6	1	8	-	1	-	-	1	9
9 <sup>a</sup> (mar/07)	6	-	2	8	-	-	-	-	-	8
10 <sup>a</sup> (abr/07)	7	6	1	14	-	-	2	-	2	16
11 <sup>a</sup> (abr/07)	4	-	-	4	1	-	-	-	1	5
12 <sup>a</sup> (mai/07)	1	-	1	2	-	-	-	1	1	3
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>34</b>	<b>6</b>	<b>90</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>103</b>

Acaraú: P1 - Cruz, P2 - Porto dos barcos pesqueiros, P3 - Mangue.

Jaguaribe: P1 - Itaíçaba, P2 - Ponte Aracati, P3 - Esgoto Compescal, P4 - Fortim.

Verifica-se que o município de Acaraú apresenta maior positividade para *Salmonella* (87,38%) em relação ao rio Jaguaribe, que mostrou incidência de 12,62%. O rio Acaraú apresenta o maior número de fazendas de camarão no oeste do Estado. Atualmente são 32, estando 13 destas em situação irregular, concentradas, principalmente, no estuário do rio Acaraú e na faixa litorânea (CAMPOS, 2003). Estes fatos associados à falta de infra-estrutura sanitária da cidade e à presença de animais (bovinos e equinos) no rio, observada durante a pesquisa, justificam a maior incidência de *Salmonella* neste rio.

Considerando a alta incidência de *Salmonella* no rio Acaraú, a alta capacidade de sobrevivência desta bactéria por longo período de tempo no meio aquático e a influência dos lançamentos de esgotos neste rio, pode-se concluir que neste município, homens e animais estão expostos à infecção pelas mais variadas vias, constituindo-se em um problema de saúde pública.

A água é uma excelente via de transmissão de agentes patogênicos para seres humanos e animais, principalmente aqueles que fazem à rota feco-oral, uma vez que as atividades urbanas e rurais contaminam os lençóis de água utilizados em nosso meio (AMARAL, 1996).

O objeto desta pesquisa foi o isolamento de *Salmonella* em amostras de água. Entretanto, os dados da literatura revelam que a contaminação da água atinge o sedimento, o camarão e posteriormente o homem e os animais que vierem a consumir a água e/ou o camarão contaminado. Estudos anteriores, em quatro fazendas de camarão do Estado do Ceará, identificaram incidência de *Salmonella* em 69% das amostras de água, 20% no sedimento e 10% no camarão (CARVALHO, 2006).

A ocorrência deste patógeno em amostras de água e camarão é de grande interesse para a saúde pública, uma vez que a legislação vigente, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2007), impõe sua ausência em 25 g de amostra de qualquer alimento, incluindo os pescados. Assim, a presença de *Salmonella* em qualquer amostra de água ou alimento representa um risco à saúde, uma vez que todas as cepas da bactéria são patogênicas ao homem (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

Nesta pesquisa, a maior quantidade de isolados de *Salmonella* foi obtida do ponto 1 do rio Acaraú (controle). Apesar de situar-se antes da cidade, onde não há interferência antropogênica, o aporte de excrementos de animais observados nas margens do rio justifica este resultado.

O ponto 2 (Porto dos pescadores) desse mesmo rio ocupou o segundo lugar em índice de contaminação por *Salmonella* o que se deve a falta de infra-estrutura sanitária da cidade, que favorece o lançamento de esgotos *in natura* no leito do rio. Estes dados confirmam os encontrados em pesquisa que avaliou a influência do lançamento de águas de esgoto na balneabilidade das praias de Fortaleza-CE, que constatou que regiões distantes dos emissários também possuem alto índice de contaminação pela enterobactéria (MELO et al. 1997). Confirmam também a pesquisa que estudando a qualidade microbiológica da água em quatro fazendas de camarão no Estado do Ceará, verificou que aquela situada próxima ao terminal

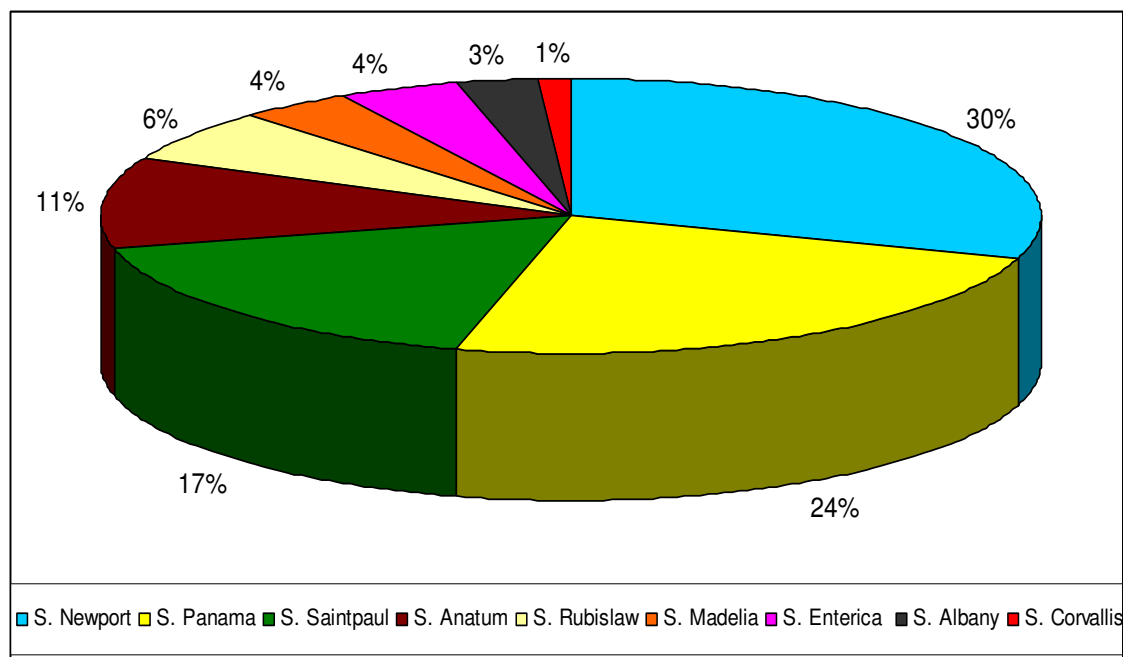
pesqueiro de Acaraú, foi a que apresentou os maiores valores de contaminação (CARVALHO, 2006).

Nessa pesquisa, a incidência de *Salmonella* quando relacionada à localização dos pontos de coleta em ambos os estuários estudados, atenta para o seguinte fato: a atividade da carcinicultura não parece ser o fator preponderante da contaminação pela bactéria, uma vez que os pontos estudados no rio Acaraú se situavam antes das carciniculturas; enquanto aqueles do rio Jaguaribe, se localizavam ao longo delas. Mesmo assim, no rio Jaguaribe verificou-se a menor ocorrência do microrganismo, com número de isolados de *Salmonella* relativamente igual nos quatro pontos estudados, com menor valor no ponto 1 (controle). Entretanto, estes dados discordam daqueles que apontam o impacto negativo causado pelas carciniculturas do Jaguaribe aos municípios desta região (FIGUEIREDO et al. 2005).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2008a e 2008b), nas Resoluções 274 e 357 estabelece diretrizes ambientais para o enquadramento dos tipos de água. Entretanto, não contempla limites para índices de salmonelas em águas destinadas à balneabilidade e à aqüicultura. Desse modo, os resultados da presente pesquisa no que concerne à presença de *Salmonella*, não podem ser comparados a um padrão legal vigente, impossibilitando a classificação dos valores obtidos em baixos ou elevados.

Informações sobre a prevalência e a diversidade dos sorovares de *Salmonella* na superfície da água são essenciais para a epidemiologia e ecologia destas espécies.

A Figura 6 mostra os 9 sorovares identificados e a porcentagem de ocorrência entre as 103 cepas confirmadas como *Salmonella*.



**Figura 6** - Isolados de *Salmonella* identificados em amostras de água dos rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Pode-se observar que dentre as 103 cepas isoladas de *Salmonella*, figuram os identificados: *S. Newport* (30%), *S. Panama* (24%), *S. Saintpaul* (17%), *S. Anatum* (11%), *S. Rubislaw* (6%), *S. Madelia* (4%), *S. subs. enterica* (4%), *S. Albany* (3%), e *S. Corvallis* (1%). Alguns destes sorovares foram também descritos no conteúdo estomacal de peixes tropicais de água doce, na ração e no sedimento dos tanques de criação no município de Botucatu-SP (LINDER, 2002), sendo os sorovares *S. Panama*, *S. Newport*, *S. Saintpaul* e *S. entérica* comuns aos descritos nesta pesquisa; bem como *S. Newport*, *S. Anatum*, e *S. Albany* identificados em cepas isoladas dos Rios Choró, Coreaú, Jaguaribe e Acaraú no estado do Ceará (CARVALHO, 2006).

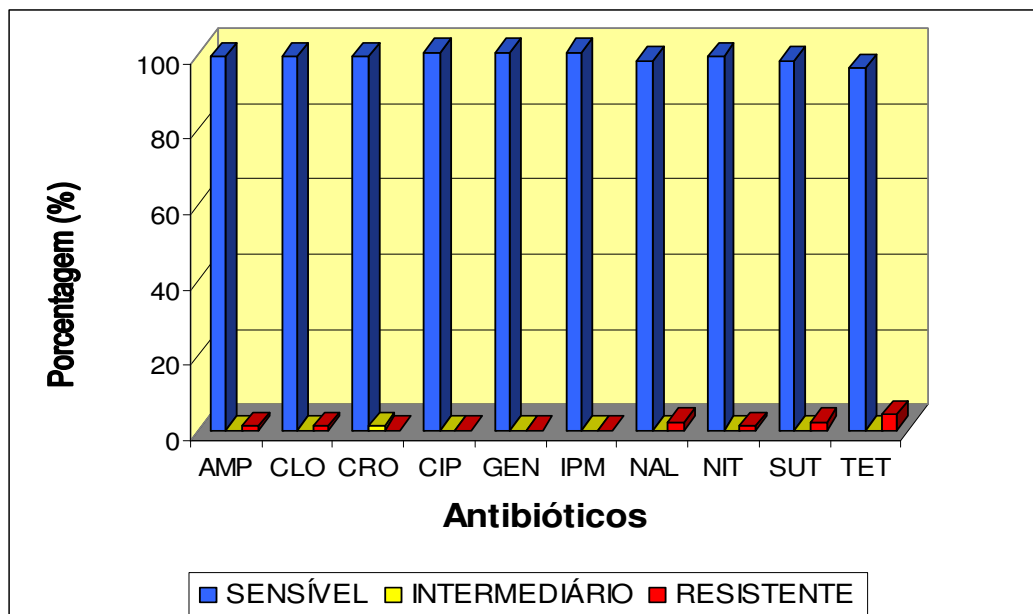
Os sorovares *S. Newport*, *S. Anatum* e *S. Albany* são comuns nas águas dos rios Acaraú e Jaguaribe, fato também descrito por PARENTE (2005) e CARVALHO (2006). Esses resultados podem sinalizar a ocorrência destes sorovares na população do estado e, portanto, a sua eliminação na forma de esgoto nas águas dos referidos rios.

### 3.2 – Resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos

A Tabela 5 e as Figuras 7 e 8 apresentam o perfil de sensibilidade/resistência de *Salmonella* spp isoladas dos vários pontos de coleta dos Rios Acaraú e Jaguaribe frente aos diversos grupos de antimicrobianos testados.

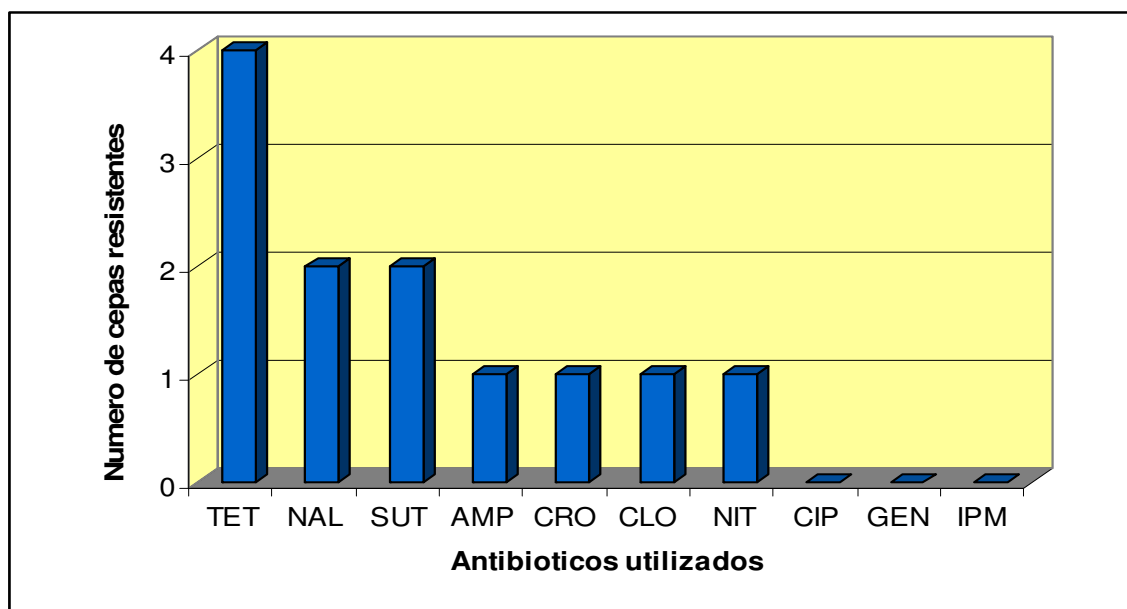
**Tabela 5** – Percentual de sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp (N = 103) isoladas de amostras de água do dos Rios Acaraú e Jaguaribe, situados no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Família	Antibiótico	Disco (µg)	Sensível		Intermediário		Resistente	
			n	%	n	%	N	%
Penicilinas	Ampicilina	10	102	99	0	0	1	1
Quinolonas	Ac. Nalidíxico	30	101	98	0	0	2	2
	Ciprofloxacina	5	103	100	0	0	0	0
Cefalosporina	Ceftriaxona	30	102	99	1	1	0	0
Cloranfenicol	Cloranfenicol	30	102	99	0	0	1	1
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10	103	100	0	0	0	0
β-lactâmicos	Imipenem	10	103	100	0	0	0	0
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	25	101	98	0	0	2	2
Tetraciclina	Tetraciclina	30	99	96	0	0	4	4
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	300	102	99	0	0	1	1



**Figura 7** – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de *Salmonella* spp aos diversos grupos de antimicrobianos.

TET = tetraciclina 30µg, NAL = ácido nalidíxico 30µg, SUT = sulfametoxazol 25µg, AMP = ampicilina 10µg, CRO = ceftriaxona 30µg, CLO = cloranfenicol 30µg, NIT = nitrofurantóina 300µg, CIP = ciprofloxacim 5µg, GEN = gentamicina 10µg, IPM = imipenem 10µg.



**Figura 8** – Padrão de resistência das cepas de *Salmonella* spp aos diversos grupos de antimicrobianos.

TET = tetraciclina 30µg, NAL = ácido nalidíxico 30µg, SUT = sulfametoxazol 25µg, AMP = ampicilina 10µg, CRO = ceftriaxona 30µg, CLO = cloranfenicol 30µg, NIT = nitrofurantóina 300µg, CIP = ciprofloxacim 5µg, GEN = gentamicina 10µg, IPM = imipenem 10µg.

Das 103 cepas confirmadas e identificadas como *Salmonella* e testadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, 99 mostraram-se sensíveis. Dentre as quatro cepas que apresentaram resistência, verifica-se que 4% delas foram resistentes à tetraciclina, 2% ao ácido nalidíxico e 2% ao sulfametoxazol. Os menores percentuais de resistência (1%) foram verificados para a ampicilina, cloranfenicol e nitrofurantoina. Observa-se ainda, o percentual de 1% para o ceftriaxona na categoria intermediário (Tabela 5 e Figura 7). Do total das cepas testadas, observamos que quatro isolados (3,8%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados (Figura 8).

De acordo com os dados apresentados, constata-se o maior número de resistência à tetraciclina. No entanto, os antibióticos ciprofloxacina, gentamicina e imipenem, pertencentes ao grupo dos quinolonas, aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos, respectivamente, foram aqueles que as bactérias se mostraram sensíveis, caracterizando-se como os antibióticos de maior eficácia contra as salmonelas isoladas dos dois rios estudados.

A frequência elevada de resistência para tetraciclina é um resultado presumível, pois a tetraciclina é um dos mais antigos antimicrobianos usados tanto para tratamento, como para promotor de crescimento (FUZIHARA, 2001). Porém, no Brasil, as tetraciclinas foram banidas em 1998 como aditivos alimentares em rações de animais, mas continuam sendo utilizados (ROSSI, 2005).

Os antibióticos de eleição para as salmoneloses são as cefalosporinas e as quinolonas (LOPEZ et al. 1994). JUNCO DIAZ et al. (2006) estudando o perfil de resistência de isolados de *Salmonella* provenientes do Rio Almendares (Cuba) encontraram 100% (40 cepas) de susceptibilidade para ceftriaxona e ciprofloxacina, ambos de 3ª geração, assim como para os aminoglicosídeos.

Nesta pesquisa, verificou-se total sensibilidade ao ciprofloxacina e sensibilidade intermediária para o ceftriaxona. Estes resultados também foram observados em isolados de *Salmonella* provenientes do Rio Almendares (Cuba) onde 100% das cepas (40) foram susceptíveis ao ciprofloxacina e ceftriaxona (JUNCO DIAZ et al. 2006). Esse resultado é preocupante, uma vez que a ceftriaxona é um antibiótico de 3ª geração e o de eleição para a salmonelose (LOPEZ et al. 1994).

Os mesmos antibióticos utilizados nesta pesquisa foram testados em cepas de *Vibrio*, isoladas de ambiente de criação do camarão *Litopenaeus vannamei* situado nos estuários dos rios Coreaú (COSTA, 2006; REBOUÇAS, 2008), Acaraú e Jaguaribe (REBOUÇAS, 2008), situados no Ceará. Os resultados mostraram cepas resistentes a ampicilina e sensibilidade de todos os isolados a tetraciclina no primeiro caso. A seguir, analisou-se a resistência a ampicilina e a tetraciclina, e sensibilidade total para o ácido nalidíxico, gentamicina, imipenem, nitrofurantoina e sulfametoxazol-trimetropim no segundo caso.

Embora o gênero *Vibrio* não tenha sido objeto desse estudo, os dados são importantes como indicativos do possível contato físico entre os diferentes gêneros de bactérias no meio aquático, possibilitando alta frequência na troca de elementos genéticos móveis, como plasmídios de resistência aos antibióticos. Neste estudo, as cepas de *Salmonella* resistentes à tetraciclina, ao ácido nalidíxico, nitrofurantoina e sulfametoxazol constituem grave ameaça tanto para as fazendas de camarão como para a saúde pública em geral. Essa bactéria, como se observa, pode facilmente transferir seus genes de resistência para os vibrios estudados naquele ecossistema.

Resultados deste estudo mostram que dos 90 isolados de *Salmonella* provenientes do rio Acaraú, 100% foram sensíveis aos antibióticos testados. A total sensibilidade observada nestas cepas é justificada pelo fato das amostras de água analisadas nesse rio, terem sido coletadas em pontos situados antes das carcinoculturas, desprovidos dessas substâncias ativas.

O perfil de resistência obtido para os 13 isolados do Rio Jaguaribe mostram que 3 destas cepas (23,07%) apresentaram resistência a mais de um antibiótico, e 7,71% foram resistentes a pelo menos um deles (Tabela 6).

**TABELA 6** – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de água do rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Cepa	Espécie	PERFIL									
		AMP	NAL	CIP	CLO	CRO	GEN	IPM	NIT	TET	SUT
27	<i>S. Rubislaw</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	<i>S. Saintpaul</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	<i>S. Albany</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	<i>S. Anatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	<i>S. Saintpaul</i>	R	R	S	R	I*	S	S	R	R	R
68	<i>S. enterica sub. enterica</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
69	<i>S. Newport</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
70	<i>S. Albany</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
72	<i>S. Albany</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
94	<i>S. Anatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
95	<i>S. Anatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
100	<i>S. Newport</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
103	<i>S. Saintpaul</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP = Ampicilina; CLO = Cloranfenicol; CRO = Ceftriaxona; CIP = Ciprofloxacim; GEN = Gentamicina; IPM = Imipenem; NAL = Ácido nalidíxico; NIT = Nitrofurantoina; SUT = Sulfametoxazol; TET = Tetraciclina; \* = 2ª Subpopulação; S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

As estirpes resistentes aos antibióticos nas amostras de água do rio Jaguaribe foram isoladas nos pontos de coleta localizados próximos aos empreendimentos de carcinicultura. Este fato sugere o uso de antibióticos pelos carcinicultores e seu descarte naqueles rios. O surgimento da resistência antimicrobiana em espécies de *Salmonella* não-tifóide é um sério problema de saúde pública em todo mundo, pela possibilidade de aumentar a virulência destes patógenos (CARVALHO et al. 2006).

Nesta pesquisa, a tetraciclina foi o antibiótico que apresentou menor eficiência contra as salmonelas testadas, com perfis de resistência para 4 (30,76%) dos isolados. A resistência para sulfametoxazol e ácido nalidíxico apresentadas foi de 3 (23,07%) e 2 (15,38%), respectivamente. Resultados semelhantes foram descritos para *Salmonella* nos Estados do Ceará, Santa Catarina e Paraná que demonstraram resistência à tetraciclina (CARVALHO et al. 2006; VITAL BRASIL et al. 1999).

A utilização de antibióticos pelas carciniculturas não é relatada pelos produtores, entretanto, a presença de estirpes resistentes nas águas do rio com proximidade ao local onde se desenvolve esta atividade comercial está confirmada.

Conseqüentemente, a sensibilidade contida nos isolados em águas mais afastadas, indicam que há uso dos antimicrobianos pelas carciniculturas.

A Tabela 7 apresenta o perfil de multi-resistência das cepas de *Salmonella* através do diâmetro em milímetros das zonas de inibição obtidas, frente aos antimicrobianos testados.

**Tabela 7** – Perfil de multi-resistência das cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de água do rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007, frente aos antibióticos testados.

Cepa	Espécie	Local de coleta	Perfil de Sensibilidade		
			Sensível	Intermediário	Resistente
64	<i>S. Saintpaul</i>	P1	CIP, IPM, GEN	CRO*	AMP, NAL, CLO, NIT, SUT, TET
69	<i>S. Newport</i>	P2	AMP, NAL, CLO, NIT, CRO, CIP, IPM, GEN	-	SUT, TET
70	<i>S. Albany</i>	P3	AMP, CLO, NIT, CRO, CIP, IPM, GEN	-	NAL, SUT, TET
72	<i>S. Albany</i>	P4	AMP*, NAL, CLO, NIT, SUT, CRO, CIP, IPM, GEN	-	TET

AMP = Ampicilina; CLO = Cloranfenicol; CRO = Ceftriaxona; CIP = Ciprofloxacim; GEN = Gentamicina; IPM = Imipenem; NAL = Ácido nalidíxico; NIT = Nitrofurantoina; SUT = Sulfametoxazol; TET = Tetraciclina; \* = 2<sup>a</sup> Subpopulação; S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente.

Foram observados três diferentes perfis de multi-resistência: para cepa 64 (sorovar *S. Saintpaul*), resistente a seis dos dez antibióticos testados (AMP-NAL-CLO-NIT-SUT-TET), cepa 69 (sorovar *S. Newport*) resistente a dois antibióticos (SUT-TET) e cepa 70 (sorovar *S. Albany*) resistente a três antibióticos (NAL-SUT-TET). Dentre os isolados houve ainda a presença de subpopulação para a cepa 64 com resistência intermediária a ceftriaxona (CRO), e ainda outra para o isolado 72, com sensibilidade para a ampicilina e resistência à tetraciclina. Estes resultados confirmam os descritos para *Salmonella* isolada de diferentes regiões do Brasil, oriundas de várias fontes, encontrando perfis de resistência para *S. Albany* (NAL, SUT e TET) e *S. Saintpaul* (AMP e TET) (PEIRANO et al. 2006).

As cepas 69 e 70 também apresentaram perfis de multi-resistência ao sulfametoxazol, à tetraciclina e ao ácido nalidíxico. As cepas com perfis de multi-resistência (64, 69 e 70) são oriundas de pontos distintos do mesmo local de coleta, o rio Jaguaribe. Todas elas apresentaram resistência comum à tetraciclina; tendo sido este antibiótico para o qual os microrganismos apresentaram o maior índice de resistência.

Neste estudo, a resistência à tetraciclina observada nas cepas oriundas do rio Jaguaribe em amostras coletadas em pontos próximos das carcinoculturas, confirma o uso de oxitetraciclina nas criações de camarão. A resistência apresentada à tetraciclina é preocupante, uma vez que, em casos de surtos como, por exemplo, de cólera, as estirpes resistentes iriam comprometer o tratamento clínico, pelo fato da tetraciclina (ou doxaciiclina) ser a droga de escolha para a terapia da cólera (CAMPOS, 2004).

No Brasil o uso de oxitetraciclina (família das tetraciclinas) é bastante comum em pisciculturas comerciais para o controle de surtos de doenças bacterianas e como medida profilática. Seu uso contínuo pode causar aumento da frequência de isolados bacterianos resistentes e aumentar quantitativamente a resistência, dificultando tratamentos futuros e elevando o risco para a cadeia alimentar humana (PEREIRA JÚNIOR et al. 2006).

Os microrganismos multi-resistentes representam uma ameaça à saúde pública, principalmente para crianças e idosos que utilizam os locais públicos como espaços de lazer, podendo ser contaminados por salmonelas de difícil tratamento, pois alguns antibióticos utilizados na medicina não possuem atividade contra esses microrganismos (MALLMANN et al. 2007).

A resistência aos antibióticos pelos microorganismos resulta em um termo chamado poluição genética que é a introdução de novo material genético ou de transferência de genes no ambiente, sendo resultado de atividades antropogênicas (PAUL et al., 1991). Além disso, as bactérias patogênicas desenvolvem numerosas estratégias para resistir à ação dos antibióticos, incluindo modificação e inativação da droga, ou a exclusão do antibiótico (GROHMANN et al. 2003).

A Tabela 8 apresenta os resultados do processo da cura plasmidial para as cepas de *Salmonella* isoladas nas amostras de água.

**Tabela 8** – Resultado do tratamento da cura de plasmídio das cepas com perfil de resistência isoladas de amostras de água do Rio Jaguaribe-Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Local de coleta	Cepa	Antibiótico	Tratamento da cura		
			LB sem AO	LB com AO	Perda de plasmídio
			sensibilidade	sensibilidade	
Rio Jaguaribe	64	AMP	R	R	N
		CLO	R	R	N
		CRO	I*	I	N
		NAL	R	R	N
		NIT	R	R	N
		SUT	R	R	N
		TET	R	I	N
	69	TET	R	R	N
	70	NAL	R	R	N
		SUT	R	R	N
		TET	R	R	N
	72	AMP	S*	S*	N
		TET	R	S	<b>P</b>

AMP = Ampicilina; CLO = Cloranfenicol; CRO = Ceftriaxona; NAL = Ácido nalidíxico; NIT = Nitrofurantoina; SUT = Sulfametoxazol; TET = tetraciclina; S = sensível; I = intermediário; R = resistente; \* = 2ª Subpopulação; \* = 3ª Subpopulação; N = negativo para perda de plasmídio; P = positivo para perda de plasmídio; LB = Caldo Luria-Bertani; AO = Acridini-orange.

Das quatro cepas envolvidas no processo da cura plasmidial, apenas uma (25%) perdeu o plasmídio de resistência. Dessa forma, a resistência plasmidial foi confirmada para a cepa 72 para tetraciclina (TET). De maneira semelhante, em experimentos de cura plasmidial em 470 estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram encontrados baixos percentuais de perda plasmidial (<0,2%) (IMRE et al., 2006). Do mesmo modo, o perfil plasmidial de multi-resistência em cepas de *Salmonella* isoladas de diferentes fontes e regiões do Brasil, identificou plasmídios com este fator, à tetraciclina (COSTA et al. 2006).

Sabe-se que os plasmídios contêm genes de resistência e muitas outras características. Eles podem se replicar independentemente do cromossomo hospedeiro, sendo distinguidos por suas origens e repetições, e uma única bactéria pode abrigar múltiplos plasmídios (ALEKSHUN & LEVY, 2007).

Os isolados 64, 69 e 70 apresentaram resistência aos antibióticos AMP, CLO, NAL, NIT, SUT, TET e CRO (Intermediário) e esta resistência mostrou-se relacionada a genes cromossômicos, uma vez que essa característica não foi perdida. Resistência cromossômica também foi descrita em cepas de *Salmonella*, oriundas de diversas fontes de contaminação da cadeia alimentar no Brasil, no período de 1999 a 2003 (MEDEIROS, 2006).

A resistência cromossômica depende de mutação espontânea, um evento raro; no entanto, ela é dirigida quase sempre a uma só droga e os genes são transferidos com frequência relativamente baixa. Por isso, seu impacto clínico é menor que o da resistência plasmidial. Entretanto, constatou-se que a resistência cromossômica observada nesse estudo estava dirigida a duas ou mais drogas. Além do mais, bactérias sensíveis podem receber genes cromossômicos mutantes de bactérias já resistentes, através dos processos de transformação, conjugação e transdução (ALTERTHUM, 2008).

Observou-se ainda que as cepas 64 e 72 com perfis de sensibilidade intermediária para o ceftriaxona (CRO) e sensível para a ampicilina (AMP) respectivamente, apresentaram subpopulações para o ceftriaxona (CRO) e ampicilina (AMP), e que após o processo da cura plasmidial elas não perderam essa característica, permanecendo a 2<sup>a</sup> subpopulação para a cepa 64, enquanto que a cepa 72, apresentou ainda uma 3<sup>a</sup> para o antimicrobiano ampicilina (AMP). Certamente, essas subpopulações também possuem genes de resistência cromossômica, pelo fato de apresentarem reincidências após o processo da cura.

Pesquisas acerca da incidência de múltipla resistência aos antibióticos em bactérias isoladas de ambientes aquáticos, são de grande importância para ampliar nossos conhecimentos sobre essas estirpes, o consumo de drogas, e seus efeitos sobre a terapia em camarão, bem como em doenças humanas (MANJUSHA et al. 2005).

Os valores obtidos da Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos testados (ampicilina, cloranfenicol, ceftriaxona, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, sulfametoxazol e tetraciclina), para os quais as cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de água, se mostraram resistentes, são apresentados na Tabela 9

**Tabela 9** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ampicilina, cloranfenicol, ceftriaxona, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, sulfametoxazol e tetraciclina para as cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de água do Rio Jaguaribe no Estado do Ceará, no período de novembro/2006 a maio/2007.

Cepa	Espécie	Antibióticos (µg/mL)						
		AMP	CLO	CRO	NAL	NIT	SUT	TET
64	<i>S. Saintpaul</i>	10-15	35-40	30-35*	30-35	>500	>500	35-40
69	<i>S. Newport</i>	-	-	-	-	-	>500	35-40
70	<i>S. Albany</i>	-	-	-	100-105	-	>500	35-40
72	<i>S. Albany</i>	>500*	-	-	-	-	-	35-40

AMP = Ampicilina; CLO = Cloranfenicol; CRO = Ceftriaxona; NAL = Ácido nalidíxico; NIT = Nitrofurantoina; SUT = Sulfametoxazol; TET = tetraciclina; R = resistente; \* = 2ª Subpopulação.

De acordo com os resultados expressos nesta tabela, observa-se que a maioria das cepas, 4 (75%) apresentou caráter de múltipla resistência, uma vez que se mostraram assim, a mais de um antibiótico de famílias diferentes.

O maior valor da CIM encontrada neste estudo foi observado nas cepas 64, 69 e 70, para o antibiótico sulfametoxazol (> 500 µg/mL) que foi a concentração máxima testada neste estudo. Deste modo, conclui-se que este foi pouco eficiente contra as salmonelas testadas. De modo semelhante, a ampicilina mostrou-se pouco eficiente para a 2ª subpopulação da cepa 72, identificada como *Salmonella* Albany, tendo atingido um valor de CIM maior que 500 µg/mL. Contrariamente, esse mesmo antibiótico apresentou um valor mínimo de CIM de 10 a 15 µg/mL, para *Salmonella* Saintpaul (cepa 64).

Os valores da CIM encontrados para ampicilina, foram de 10-15 para cepa 64, e >500 para cepa 72. Para o cloranfenicol, o valor encontrado foi de 35-40 para cepa 64, e no intervalo de 35-40, para tetraciclina em todas as cepas (Tabela 9). Estes valores foram equivalentes aos encontrados para isolados humanos de *Salmonella*, com valores de susceptibilidade superior a 256 µg/mL para ampicilina, cloranfenicol, e 128 µg/mL para tetraciclina (HAN et al. 2006).

A cepa 70 também identificada como *Salmonella* Albany apresentou resistência a três antibióticos, sendo o ácido nalidíxico, o que apresentou o segundo maior valor de CIM, atingindo o intervalo de 100 a 105 µg/mL.

A *Salmonella* Saintpaul (cepa 64), apesar de sensível para o ceftriaxona (CRO), apresentou uma 2ª e 3ª subpopulação, com valor de CIM entre 30 a 35 µg/mL. Esta mesma cepa, apresentou valor da CIM maior que 500 µg/mL para o nitrofurantoina e o sulfametoxazol, caracterizando-se como multiresistente, por apresentar-se assim, a seis dos dez antibióticos testados.

Das quatro cepas que se mostraram resistentes aos antibióticos, todas apresentaram resistência à tetraciclina, tendo sido esse antibiótico o de menor eficácia contra as salmonelas testadas.

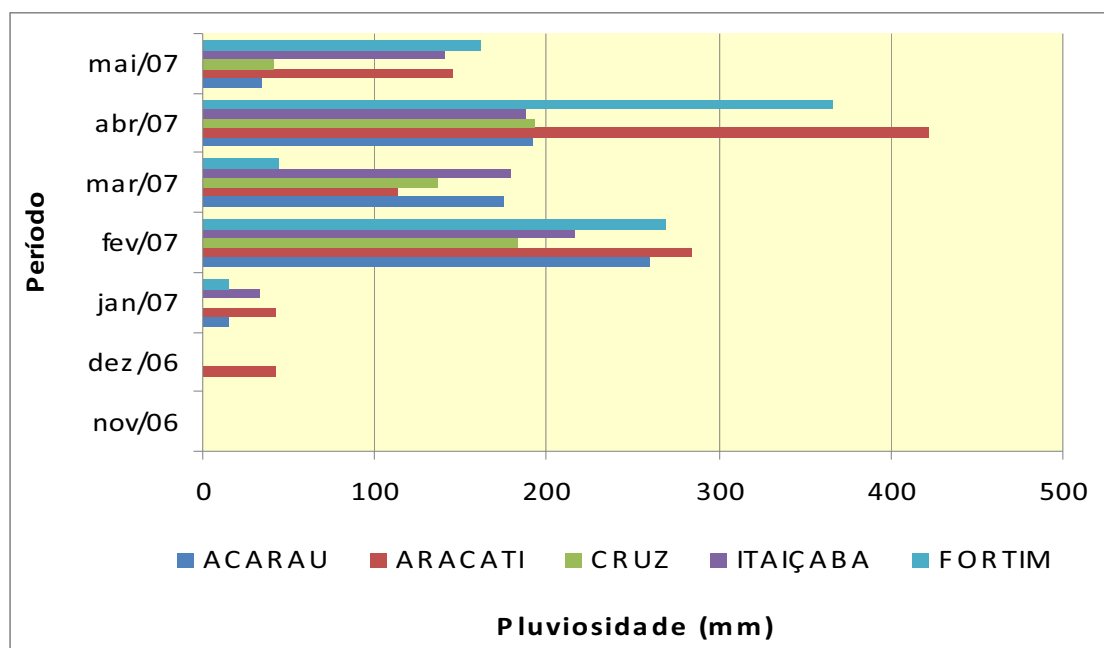
A resistência as tetraciclinas ocorre por aquisição de plasmídios de resistência. As proteínas denominadas Tet (Tet A, B, C e D) uma vez formadas, deslocam-se dos ribossomos para a membrana citoplasmática, provocando a saída quase imediata do antibiótico da célula impedindo sua ação (ALTERTHUM, 2008).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno ecológico originado da resposta da bactéria ao amplo uso de antibióticos e da presença deste no ambiente, representando um dilema terapêutico mundial (ITO, 2004).

Os dados encontrados nesta pesquisa apontam para a necessidade de divulgação de práticas de educação sanitária, principalmente no que diz respeito ao uso indiscriminado de antibióticos nas carcinoculturas, uma vez que a maioria dos aqüicultores faz uso profilático de antibióticos, e muitos deles não têm informações sobre as práticas de aplicação eficiente e segura desses medicamentos. É provável que estas medidas possam minimizar os impactos ambientais sem afetar o nível de produção de camarões.

### 3.3 – Parâmetros ambientais e Incidência de *Salmonella*

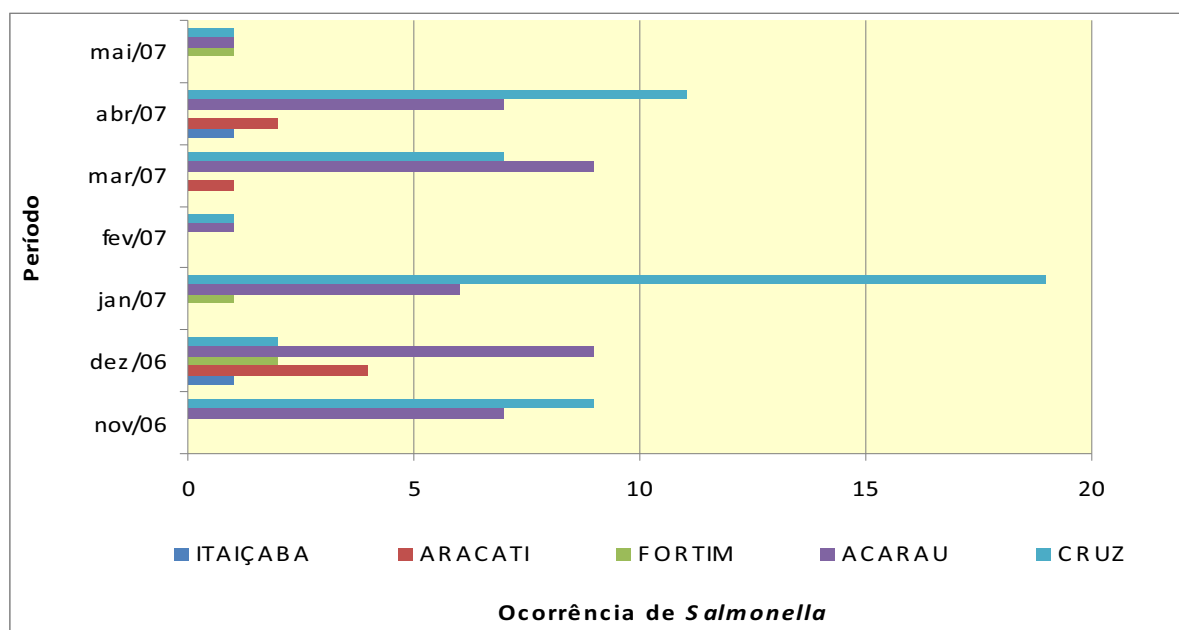
Os dados referentes à precipitação pluvial mensal ocorrida no período de novembro/06 a maio/07 nos municípios de Acaraú, Aracati, Cruz, Fortim e Itaiçaba são observados na Figura 9. Os maiores valores de pluviosidade ocorreram de fevereiro/07 a abril/07, com máxima em abril/2007, tendo sido os meses de novembro/06 a janeiro/2007 os meses mais secos.



**Figura 9** - Precipitação mensal total (mm) de novembro/06 a maio/07 nos municípios de Acaraú, Aracati, Cruz, Itaiçaba e Fortim (FUNCEME-Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos) Fortaleza-CE.

Nesta pesquisa, verificou-se maior incidência de *Salmonella* no ambiente aquático, nos meses com menores valores de pluviosidade (novembro/06 a janeiro/07). Neste período foram isoladas 60 cepas de *Salmonella*, contra 43 no período chuvoso (Figura 10). Estes dados confirmam os descritos para os rios cearenses que apresentaram maior incidência de sorotipos de *Salmonella* (31%), nos meses de novembro e dezembro, período seco (CARVALHO, 2006).

É possível que a estiagem contribua para que os volumes dos rios diminuam, aumentando a concentração da matéria orgânica, facilitando assim a detecção de bactérias entéricas (MENEZES et al. 2006).



**Figura 10** – Ocorrência de *Salmonella* nos municípios Acaraú, Cruz, Aracati, Fortim e Itaiçaba no período de novembro/06 a maio/07.

As variáveis ambientais medidas nas amostras de água dos rios Acaraú e Jaguaribe mostraram valores de temperatura oscilando de 29 a 34 °C; o pH variando de 6,79 a 8,46 e a salinidade com uma variação de 0 a 43‰ entre os diferentes pontos de coleta. Estes resultados corroboram para os descritos em amostras de água de propriedades rurais em Botucatu-SP, onde a maior positividade para a *Salmonella* foi observada numa faixa de pH entre 6,0 e 7,0 e valores de temperatura superiores a 18 °C (SOUZA, et al. 1992; MOSCARDI JUNIOR, 2005).

Nesta pesquisa, os maiores valores de isolados de *Salmonella* (48,5%), foram obtidos no ponto 1 (controle) do rio Acaraú. Esse ponto de coleta apresentou valores de pH que variaram de 6,8 a 8,0 e a temperatura entre 30 e 34 °C. Esses dados sugerem que a presença de *Salmonella* naquele ambiente possivelmente seja influenciada pelas altas temperaturas da região. A temperatura ideal para a multiplicação da *Salmonella* encontra-se na faixa de 35 a 37 °C, seu pH ótimo fica próximo de 7,0 e a concentração de sal não deve ser superior a 9% (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Neste estudo, o rio Jaguaribe apresentou número de isolados de *Salmonella* relativamente iguais nos quatro pontos estudados, apesar das altas concentrações de sais (18 a 42%) verificadas no ponto 4 (Fortim) do referido rio, onde se observava o encontro do rio com o mar, fato que contrapõe as exigências para sobrevivência desta bactéria, embora reconhecidamente alguns sorovares de *Salmonella* apresentem exceções para algumas características comuns do gênero (POPOFF & LE MINOR, 2005).

Resumidamente, temos que o longo período de seca, associado à falta de infraestrutura sanitária das regiões estudadas gera impactos negativos ao meio ambiente, afetando a qualidade da água exigida para a criação do camarão e comprometendo seriamente a sua exploração econômica.

#### 4 - CONCLUSÕES

Os estudos realizados sobre a susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial em cepas de *Salmonella* spp isoladas de dois estuários do Estado do Ceará, permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

- ↪ Constatou-se maior incidência de *Salmonella* no ambiente aquático, nos meses com menores valores de pluviosidade;
- ↪ Os maiores percentuais de isolados identificados foram: *S. Newport* (30%), seguida de *S. Panama* (24%);
- ↪ No rio Acaraú foi encontrado o maior índice de contaminação (87,38%);
- ↪ Foram observados três diferentes perfis de multi-resistência, com cepas apresentando-se em seis (AMP, NAL, CLO, NIT, SUT, TET), três (NAL, SUT, TET) e dois (SUT, TET) dos dez antibióticos testados;
- ↪ A presença de *Salmonella* em rios que abastecem carciniculturas aponta para dois problemas de saúde pública: estirpes antibiótico-resistentes e a contaminação humana pelo consumo dos crustáceos.

## 5 - REFERÊNCIAS

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Org.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. v. 1, p. 67-84.

ALVES, L. M. C.; COSTA, N. F.; SILVA, M. S.; SALES, S. S.; CORREIA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 57-58, 2001.

AMARAL, L. A. Controle da qualidade microbiológica da água utilizada em avicultura. In: MACARI, M.(Ed.). **Água na avicultura industrial**. Jaboticabal: Funep, 1996. p. 93-117.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p.97-103, 2003.

ARGÔLO FILHO, R. C. A. **Identificação, sorotipagem e diferenciação pela PCR-DGGE de sorotipos de *Salmonella* isolados de teiús criados em cativeiro**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2007.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; VAGIONA, D. G. Diversity of *Salmonella* spp. And fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. **Environmental Research**, Orlando, v. 99, n. 2, p. 278-284, 2005.

BARBIERI JUNIOR, R. C.; OSTRENYK NETO, A. **Camarões marinhos-engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. v. 2.

BARCINA, I; LEBARON, P.; VIVES-REGO, J. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. **Microbial Ecology**, New York, v. 23, n. 1, p. 1-9, 1997.

BARRACO, M. A. M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M. J.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, A. P. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. p. 51-74.

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

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

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. 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 mar. 2007.

BRASIL. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_274\\_00.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_274_00.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2008a.

BRASIL. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 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: 20 jan. 2008b.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Histórico da carcinicultura brasileira**. Disponível em: <[http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias\\_camarao\\_marinho.php](http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias_camarao_marinho.php)>. Acesso em: 18 ago. 2004.

CÂMARA, F. P.; COSTA, G. A.; HOFER, E.; ALMEIDA, D. F. Drug resistance in *Salmonella* strains isolated from raw sewage in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 421-424, 1982.

CAMPOS, A. A. **A Zona Costeira do Ceará: diagnóstico para a gestão integrada**. Fortaleza: Aquasis, 2003. p. 293.

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

CARDONHA, A. M. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; HOLLAND, H. N.; MELO, J. L. S.; BEZERRA, M. A. S.; DAMASCENO, K. S. F. S. C. Monitoramento da poluição da água das galerias pluviais e do mar por meio de avaliação físico-química e microbiológicas. **Arquivos Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 38, n. 1, p. 43-48, 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA, N.M.S.Q. Pesquisa de *Salmonella* spp em ovos comerciais, analisados no Laboratório de Patologia avícola de Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 92/93, p. 76-79, 2002.

CARVALHO, F. C. T. **Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*) em quatro fazendas de camarão do Estado do Ceará**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CARVALHO, F. C. T.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SOUSA, O. V.; REIS, C.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. S. F. Resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* isoladas de água, sedimento e camarão de quatro fazendas de carcinicultura do Estado do Ceará. In: SIMPÓSIO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, 3., 2006, Rio de Janeiro. **Resumos...** p. 43.

CHIU, C.; GUU, Y.; LIU, C.; PAN, T.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 3, p. 364-377, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005. Disponível em: <<http://enews.nccls.org/clsi/issue/2006-12-01/2.html>>. Acesso em: 20 nov. 2005.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007. Disponível em: <<http://enews.nccls.org/clsi/issues/2006-12-01/2.html>>. Acesso em: 20 dez. 2007.

COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; REIS, E. M.; RODRIGUES, D. P. Características plasmidiais de diferentes sorovares de *salmonella* sp. isoladas no Brasil no ano de 2005. In: SIMPÓSIO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, 3., 2006, Rio de Janeiro. **Resumos...**

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 11-31, 1994.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p. 141-178.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W. P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 8, n. 2, p. 40-41, 2006.

EKPERIGIN H. E, NAGARAJA, K. V. *Salmonella*. **Microbial Food Borne Pathogens**, v. 14, n. 1, p.17-29, 1998.

ELEY, A. R. **Microbial food poisoning**. London: Chapman & Hall, 1994. 191 p.

EUGÊNIO, C. **Agronegócio exportação. Camarão**: Ceará tenta reverter queda nas exportações. Disponível em: <[http://www.paginarural.com.br/noticias\\_detalhes](http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes)> Acesso em: 20 set. 2005.

EUROSURVEILLANCE. **Vigilância da resistência das salmonelas aos antibióticos**. Disponível em: <<http://www.ceses.org/eurosurv>>. Acesso em: 20 dez. 1997.

FAO/OIE/WHO. **Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance.** In: REPORT OF A JOINT FAO/OIE/WHO EXPERT CONSULTATION ON ANTIMICROBIAL USE IN AQUACULTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2006, **Seoul**, Republic of Korea. p.107.

FARIAS, E. W. C. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e de *Salmonella* spp em amostras de água de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.** 2000. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FARIAS, E. W. C.; GUIMARÃES, A. M.; LOUREIRO, E. C. B. Sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Salmonella* isoladas de ambientes aquáticos e de casos de diarreia humana no município de Belém-Pará. In: SEMINÁRIOS DO CENTRO DE ESTUDOS DA COORDENAÇÃO DE ECOLOGIA HUMANA E MEIO AMBIENTE DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, 1997, Belém. Belém: COEHMA-IEC, 1997.

FEACHEM, R. G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D. **Sanitation and disease:** health aspects of excreta and wastewater management. New York: John Wiley & Sons, 1983. 321 p.

FIGUEIRÊDO, M. C. B.; ARAÚJO, L. F. P.; GOMES, R. B.; ROSA, M. F.; PAULINO, W. D.; MORAIS, L. F. S.; Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura em águas interiores. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 167-174, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2004. p. 182.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. p. 50-55.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica:** fundamentos da terapêutica racional. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. 678 p.

FUZHARA, T. O. **Freqüência e características de *Salmonella* em abatedouros de pequeno e médio portes da região do grande ABC.** 2001. 98 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 2, p. 277-301, 2003.

HAN, K. H.; CHOI, S. Y.; LEE, J. H.; LEE, H.Y.; SHIN, E. H.; AGTINI, D. M.; SEIDLEIN, L. V.; OCHIAI, R. L.; CLEMENS, J. D.; WAIN, J.; HAHN, J. S.; LEE, B. K.; SONG, M.; CHUN, J.; KIM, D. W. Isolation of *Salmonella* enterica subspecies Enterica serovar Paratyphi BdT<sup>+</sup>, or salmonella java, from Indonesia and alteration of

the d-tartrate fermentation phenotype by disrupting the ORF STM 3356. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 55, n. 12, p. 1661-1665, 2006.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOFER, E.; SILVA FILHO S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matéria-prima e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.

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

ITO, C. A. S. **Ácido nalidíxico como marcador preditivo de sensibilidade às fluorquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de urocultura**. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIOI, A. T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JUNCO DÍAZ, R. A.; SUÁREZ PITA, M. T.; WENG ALEMÁN, RUBALCABA, S. C.; GONZÁLEZ, M. I.; DÍAZ ROSA, O. E.; RODRÍGUEZ SALAZAR, M. C. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v. 6, p.150-159, 2006.

LEE, L. A.; PUHR, N. D.; MALONEY, K.; BEAN N. H.; TAUXE R.V. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989–1990. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 170, n. 11, p. 128–134, 1994.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 164, n. 4, p. 201-220, 1998.

LINDER, C. E. ***Salmonella* spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce**. 2002. 50 f. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária], Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2002.

LOPEZ, M.; SANZ, J. C.; USERA, M. A.; REINA, J. ; CARDENOSO, L. ; VASALLO, F. **Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias**: procedimientos en microbiología clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 1994. Disponível em: < <http://www.seimc.org.br>>. Acesso em: 16 jan. 2008.

LOUREIRO, E. C. B. **Contribuição ao estudo bacteriológico de *Salmonella* oriundas de diferentes fontes da região amazônica brasileira**. 1990. 102 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

MAIA, E. P. **Avaliação do uso de probiótico no cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) em viveiros de terra em sistema fechado.** 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MALLMANN, E. J. J.; REBOUÇAS, F. D. J.; AMORIM, L. N. ; NASCIMENTO, K. M.; CUNHA, F. A.; SOUSA, G. C.; SANTOS, R. S.; SOARES, K. P.; NETO, J. G. L.; MENDES, L. G.; MENEZES, E. A. **Isolamento, identificação e perfil de sensibilidade de cepas de *Salmonella* spp isoladas de ambientes aquáticos urbanos de Fortaleza.** Fortaleza, 2007.

MANJUSHA, S.; SARITA, G.B.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology.** 1, n. 4, p. 201– 206, 2005.

MARTINEZ-URTAZA, J.; MONTSERRAT. S.; NOVOA, J. Influence of Enviromental Factors and Human Activity on the Presence of *Salmonella* Serovars in a Marine Enviroment. **Applied Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 4, p. 2089-2097, 2004.

MARTINS, M. T. ***Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário.** 1979. 376 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

MARTINS, M.T.; SANCHEZ, P. S.; MARQUES, E.; MONTEIRO, C. K.; MOLINA, A. G. Ten year survey of *Salmonella* and enterovirus in raw and treated waters in the Great São Paulo area, Brazil. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 53-60, 1986.

MCDONALD, K. L.; COHEN, M. L.; HARGRETT-BEAN, N.; WELLS, I. G.; PUHR, N. D.; COLLIN, S. F.; BLAKE, P. A. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. **Journal of the American Medical Association**, Schaumburg, v. 258, n. 11, p. 1496-1499, 1987.

MEDEIROS, L. M. **Estudo sobre cepas de *Salmonella* Entérica sorovar Typhimurium resistentes a antimicrobianos de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil.** 2006. 127 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

MELO, M. T.; VIEIRA, R. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; HOFER, E. Coliformes and *Salmonella* in sewerage near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceará, Brazil). **Microbiologia**, Madrid, v. 13, n. 4, p. 463-470, 1997.

MENEZES, F.; CARVALHO, F. C. T.; LIMA, A. S.; REIS, E. M. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; HOFER, E. Pesquisa de *Salmonella* na água, solo e camarão (*Litopenaeus*

*vannamei*) de quatro fazendas de carcinicultura do Estado do Ceará. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO: SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2006, São Vicente.

**Resumo expandido...**

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. 1, p. 7-12, 2002.

MOSCARDI JUNIOR, E. **Presença de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva da carne bovina: estudo das fontes de contaminação para novilhos criados sob confinamento experimental.** 2005. 49 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MURATORI, M. C. S. **Consórcio suíno peixe: riscos ambiental e sanitário, proposta alternativa para descontaminação.** 2000. 140 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

MURRAY, C. J. Environmental aspects of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed). ***Salmonella* in domestic animals.** New York: CAB Publishing, 2000. cap. 16, p. 265-300.

NCCLS. [National Committee for Clinical Laboratory Standards](http://www.clsi.org). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically:** approved standard. 6. ed. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: < <http://www.clsi.org/source/orders/free/m7-a7f.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2003a.

NCCLS. [National Committee for Clinical Laboratory Standards](http://www.clsi.org) **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests:** approved standard. 8. ed. NCCLS document M2-A8 Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: < <http://www.clsi.org/source/orders/free/m7-a7f.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2003b.

NOGUEIRA-LIMA, A. C.; GESTEIRA, T. C. V.; MAFEZOLI, J. Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustácea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. **Aquaculture**. 254, p. 748 – 757, 2006.

NWOSU, V. C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Research of Microbiology**, Paris, v. 152, n. 5, p. 421-430, 2001.

PARENTE, L. S. **Condições higiênico- sanitárias da água e do camarão em duas fazendas de cultivo de pequeno e médio portes, no Estado do Ceará.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

PAUL, J.H.; FRISCHER, M.E.; THURMOND, J.M. Gene de transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p.1509-1515, 1991.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F. M.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella* Enterica from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, n. 2, p. 305-309, 2006.

PEI-UAN QIAN, M. C. S.; WU, I. H. N. Comparison of nutrients release among some maricultured animals. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, n. 3-4, p. 305-316, 2001.

PEREIRA JÚNIOR, D. J.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; LEAL, C. A. G. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, 2006.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

PIEDRAHITA, R. H. Detritus based aquaculture systems. **Food Research International**, Barking, v. 6, n. 3, p. 317-331, 1990.

PINTO, P. S. A. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 39-43, 2000.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (n.º. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. Genus XXXIII *Salmonella* Lignières, 1900. In: BRENNER D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2005. v. 2, p. 764-799.

REBOUÇAS, R. H. **Perfil de resistência a antimicrobianos de *Vibrio* isolado de água de viveiro e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em fazendas no Estado do Ceará**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RILEY, L. W.; COHEN, M. L.; SEALS, J. E.; BLASER, M. J.; BIRKNESS, K. A.; HARGRETT, N. T.; MARTIN, S. M.; FELDMAN, R. A. Importance of host factors in human salmonellosis caused by multiresistant strains of *Salmonella*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 149, p. 878-883, 1984.

RISTORI, A. C. **Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. Distribution of oxytetracycline plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the

tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, 2000.

RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S.; REIS, E. M. F. **Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp**: apostila. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2006. (Manual Técnico).

ROSSI, A. A. **Biossegurança em frangos de corte e saúde pública: limitações, alternativas e subsídios na prevenção de salmoneloses**. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK H.; D'ANDREA A.; ALBUQUERQUE M.C.; RAMPANELLI Y.; MACHADO N.P.; RIOS S.; FERNANDES S.A. *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 93-99, 2002.

SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J.; ADAMS, L.G. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 1, p. 3-12, 2003.

SCHMIDT, A.S.; MORTEN, S.B.; DALSGAARD, K.P. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p. 4908-4915, 2000.

SERRANO, P. H. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**. Rome: FAO, 2005. 97 p.

SOUZA, L. C.; IARIA, S. T.; PAIM, G. V. *Salmonella* e coliformes fecais em águas de bebida para animais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 321-327, 1992.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 531 p.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDEZ, A. S.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

TENOVER, F. C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 33, suppl. 3, p.S108-115, 2001.

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

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETO, N. S. E.; SOUSA, O. V.; TORRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, S. M. M. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 388 p.

VITAL BRASIL, J. M.; REIS, E. F. M.; COSTA, R. G.; SOLARI, C. A. Sorovares de *Salmonella* em animais e em matéria prima e perfil de resistência aos antimicrobianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 359.

WALLACE, H. A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: FDA-FSAN. Food and Drugs Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological analytical manual**. 2005. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-4a.html>>. Acesso em: 12 set. 2006.

WEGENER, H. C.; AARESTRUP, F. M.; GERNER-SMIDT, P.; BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum**, Denmark, v. 92, n. 1, p. 51–57, 1999.

WESTON, D. P. Ecological effects of the use of chemicals in aquaculture in Asia. In: MEETING ON THE USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN ASIA, 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines. **Proceedings...** p. 23-30.

WILLIS, C. Antibiotics in the food chain: their impact on the consumer. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 153–160, 2000.