

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

**SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E VIRULÊNCIA DE
Salmonella sp. ISOLADA DE ÁGUA E DE MOLUSCOS BIVALVES**

CARLA SILVA DA SILVEIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO, 2014**

**SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E VIRULÊNCIA DE
Salmonella sp. ISOLADA DE ÁGUA E DE MOLUSCOS BIVALVES**

CARLA SILVA DA SILVEIRA

Engenheira de Pesca

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012

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

Orientadora: Dr^a Norma Suely Evangelista-Barreto

Co-Orientadora: Dr^a Oscarina Viana de Sousa

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MARÇO, 2014

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

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
CARLA SILVA DA SILVEIRA

Norma Suely Evangelista

Profª Drª Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Orientadora)

Isabella de Mattos Mendes da Silva

Profª Drª Isabella de Mattos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Eliseth de S. Viana

Profª Drª Eliseth de Souza Viana
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola em _____

Dedico esta dissertação à minha família que me apoia em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades colocadas em meu caminho;

Agradeço a minha mãe (Marilêde), meu pai (Carlos), meus irmãos (Aldo e Adson) pelo amor, carinho e proteção incondicional e por me apoiarem nos momentos difíceis;

Ao meu companheiro (Ednaldo) por ter paciência e entender os momentos em que eu não pude ficar ao seu lado;

Aos meus sobrinhos (Alessandra, Thayla, Maria Eduarda e Henzo) que me alegravam com suas brincadeiras;

A minha tia Gilda que me incetivou a todo o momento da minha vida acadêmica, muito obrigada!

A todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental;

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Norma Suely Evangelista-Barreto por ter proporcionado o meu crescimento na área acadêmica.

A todos do Laboratório de Ciência do Mar – LABOMAR – Universidade Federal do Ceará, em especial à Professora Oscarina, Gleire e Cristiane pela paciência e colaboração no desenvolvimento do trabalho na área da biologia molecular, bem como o ensinamento transmitido.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

	Página
Tabela 1. Classe dos agentes antimicrobianos e seu mecanismo de ação	30

Capítulo 2.

	Página
Tabela 1. Descrição das cepas de <i>Salmonella</i> sp. de acordo com o local e a fonte de isolamento	47
Tabela 2. Ocorrência de resistência, múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e resistência plasmidial em cepas de <i>Salmonella</i> sp. isoladas de água e moluscos bivalves, em duas regiões da Bahia, Brasil	52
Tabela 3. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cepas de <i>Salmonella</i> sp. isoladas em amostras de moluscos bivalves e água em duas regiões da Bahia, Brasil	54

Capítulo 3.

	Página
Tabela 1. Origem e fonte dos isolados de <i>Salmonella</i>	67
Tabela 2. Iniciadores e condições de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados na investigação dos genes de virulência nos isolados de <i>Salmonella</i>	68
Tabela 3. Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação dos genes de virulência nas estirpes de <i>Salmonella</i>	69
Tabela 4. Presença dos genes de virulência nos diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> isolados em amostras de água e moluscos bivalves nos municípios de Valença e São Francisco do Conde, Bahia, Brasil	72

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2.

	Página
Figura 1. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Salmonella</i> sp. para as diferentes classes de antimicrobianos testados	49

Capítulo 3.

	Página
Figura 1. Perfil dos sorotipos de <i>Salmonella</i> isolados em amostras de água e moluscos bivalves nos municípios de São Francisco do Conde e Valença	70
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>invA</i> em nove isolados de <i>Salmonella</i> ; sendo M; marcador de peso molecular 100pb, B; Branco, linhas de 1 a 9 sorotipos de <i>Salmonella</i> e 10; controle negativo	73
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>pefA</i> em nove isolados de <i>Salmonella</i> ; sendo M; marcador de peso molecular 100pb e linhas de 1 a 9 sorotipos de <i>Salmonella</i>	74

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1	19
Revisão de Literatura: A ação antrópica em áreas de extração de moluscos bivalves compromete a inocuidade dos alimentos	
1. Pesca artesanal no estado da Bahia	22
2. Poluição das áreas estuarinas	23
3. Moluscos bivalves	24
3.1. Ostra (<i>Crassostrea</i> sp.)	24
3.2. Sururu (<i>Mytella</i> sp.)	25
4. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's)	25
5. <i>Salmonella</i>	26
6. Fatores de virulência	28
7. Resistência antimicrobiana	30
8. Concentração Inibitória Mínima – CIM	31

9. Betalactamases de Espectro Estendido – ESBL	32
Referências	33
Capítulo 2	42
Veiculação de <i>Salmonella</i> sp. resistente aos antimicrobianos em moluscos bivalves e áreas estuarinas, Bahia, Brasil	
Resumo	43
Introdução	45
Material e métodos	47
Resultados e discussão	49
Conclusão	55
Referências	56
Capítulo 3	62
Identificação e pesquisa de genes de virulência em <i>Salmonella</i> isoladas de água e de moluscos bivalves	
Resumo	63
Introdução	65
Material e métodos	67
Resultados e discussão	69
Conclusão	75
Referências	76

RESUMO

SILVEIRA, C. S. Suscetibilidade antimicrobiana e virulência de *Salmonella* sp. isolada de água e de moluscos bivalves

No litoral baiano a pesca artesanal é uma atividade que possui grande potencial econômico, devido à grande extensão de áreas estuarinas e manguezais presentes na região. O aumento da ação antrópica próximas às áreas estuarinas tem comprometido a inocuidade dos alimentos extraídos desses locais. Dentre as Doenças Transmitidas por Alimentos, a salmonelose, doença causada pela bactéria *Salmonella*, caracteriza-se como um importante problema de saúde pública em vários países do mundo, devido ao envolvimento do patógeno em diversos surtos de origem alimentar. O aumento de estirpes com resistência antimicrobiana tem sido motivo de preocupação entre os profissionais da área de alimentos e saúde, devido ao uso abusivo de antimicrobianos pela população, bem como o seu emprego em cultivos intensivos de animais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em estirpes de *Salmonella* previamente isoladas de amostras de moluscos bivalves e áreas estuarinas em duas regiões do estado da Bahia, Brasil. Para isso, foram utilizadas 27 cepas de *Salmonella*, sendo 12 provenientes de moluscos bivalves (ostra e sururu) e 15 de água de estuário. A identificação dos sorotipos foi feita por meio de triagem bioquímica e sorotipagem. Para a verificação da resistência antimicrobiana foram utilizados oito antimicrobianos pertencentes a cinco classes: cloranfenicol, betalactâmicos, tetraciclina, quinolonas e fluorquinolonas. A produção de Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL) foi detectada por meio do teste de sinergismo de disco duplo utilizando ácido clavulânico/amoxicilina como inibidor. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida pela técnica de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton. Para a pesquisa dos genes de virulência e patogenicidade foram usados os genes *invA* (patogenicidade), *pefA* (virulência do plasmídeo codificado por fímbria) e *spvC* (virulência plasmidial) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Do total de isolados, nove cepas foram identificadas como pertencentes aos sorotipos, *Salmonella* Saintpaul (1), *Salmonella* Typhimurium (2), *Salmonella*

Albany (4) e *Salmonella* Montevideo (2). Os isolados apresentaram perfil de suscetibilidade de 100% para cloranfenicol e fluoroquinolonas, 88,3% para tetraciclina e betalactâmicos e 77,7% para as quinolonas. Multirresistência foi verificada apenas nos isolados de moluscos bivalves com índice MAR de 0,25. A CIM observada para o ácido nalidixíco, ampicilina e tetraciclina foi de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 350 µg/mL, respectivamente. Nenhum dos isolados apresentaram produção de ESBL, assim como perfil de resistência mediada por plasmídeo. O gene *invA* foi detectado em quatro isolados e o gene *pefA* em dois isolados. Nenhum dos isolados apresentou o gene *spvC*. Desta forma, as salmonelas presentes em áreas de extração de moluscos bivalves apresentaram baixa resistência aos diferentes fármacos testados. Apesar da baixa prevalência de genes de virulência *invA* e *pefA* nas estirpes, a veiculação dessa bactéria em áreas de extração de moluscos bivalves é um risco para a saúde pública, quando estes são consumidos na forma *in natura*.

Palavras-chave: segurança alimentar, multirresistência, patogenicidade, virulência.

ABSTRACT

SILVEIRA, C. S. Antimicrobial susceptibility and virulence of *Salmonella* sp. isolated from water and bivalve mollusks

Artisanal fishing in Bahia coast is an activity which has great economic potential due to the large extent of mangroves and estuarine areas in the region. Increased anthropogenic activities near the estuarine areas have compromised the safety of food extracted from this local. Among the Foodborne Diseases, salmonellosis, a disease caused by *Salmonella* bacteria, is characterized as an important public health problem in many countries, due to the involvement of the pathogen in several foodborne outbreaks. The increase of antimicrobial resistance strains has been a concern among professionals in the area of food and health, due to overuse of antimicrobials by the population as well as its use in intensive farming of animals. Given the above, the aim of this study was to investigate the antimicrobial susceptibility profile and virulence factors in *Salmonella* strains previously isolated from samples of bivalve mollusks and estuarine areas in two regions of the Bahia state, Brazil. For this, 27 *Salmonella* strains were used, 12 from bivalve mollusks (oysters and mussels) and 15 estuarine water. The serotypes identification was through biochemical screening and serotyping. Chloramphenicol, beta-lactams, tetracyclines, quinolones and fluoroquinolones: for verification of antimicrobial resistance eight antimicrobials belonging to five classes were used. Production of extended - spectrum beta-lactamases (ESBL) is detected by means of the double-disk synergy test using clavulanic / amoxicillin acid as an inhibitor. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was obtained by the technique of macrodilution in Mueller-Hinton broth. A survey of virulence genes *invA* (invasion), *pefA* (plasmid-encoded fimbriae) and *spvC* (virulence plasmid) was performed using the Polymerase Chain Reaction technique (PCR). Nine strains were identified as belonging to serotypes, *Salmonella* Saintpaul (1), *Salmonella* Typhimurium (2), *Salmonella* Albany (4) and *Salmonella* Montevideo (2). Isolates showed a profile of 100% of susceptibility for chloramphenicol and fluoroquinolones, 88.3% to tetracycline and beta-lactams and 77.7% for

quinolones. Multidrug resistance was observed only in the bivalve mollusks with an MDR index of 0.25. The MIC was 100 µg/mL, 500 µg/mL and 350 µg / mL to nalidixic acid, ampicillin and tetracycline, respectively. None of ESBL producing isolates showed, as well as plasmid -mediated resistance profile. The *invA* gene was detected in four strains and *pefA* gene in two. None of the isolates showed *spvC* gene. Thus, *Salmonella* present in extraction of bivalve mollusks areas showed low resistance to different drugs tested. Despite the low prevalence of virulence genes *invA* and *pefA* in the strains, the placement of this bacterium in extraction of bivalve mollusks areas is a risk to public health when they are consumed *in natura* form.

Key-words: food security, multidrug resistance, pathogenicity, virulence

INTRODUÇÃO GERAL

A pesca artesanal é uma atividade caracterizada pela captura de diversas espécies aquáticas, realizada por pescadores que trabalham sozinhos ou juntamente com a família. Essa atividade é dividida em duas modalidades, a pesca realizada pelo homem e a mariscagem, atividade voltada à extração de mariscos na região de estuários, realizada principalmente pelas mulheres (SANTOS, 2013).

Os estuários são ecossistemas que possuem alta produtividade de matéria prima na cadeia alimentar e representam um grande depósito de nutrientes, pois abrigam muitas espécies de organismos marinhos e servem de berço para o desenvolvimento de larvas e alevinos (CAMPELLO, 2006). Devido ao crescimento populacional desordenado em cidades litorâneas, a utilização dos estuários como corpo receptor de efluentes domésticos, industriais, bem como a falta de saneamento básico, coloca em risco o desenvolvimento sustentável dos organismos ali presentes (PEREIRA et al., 2010).

No estado da Bahia tem-se um consumo significativo de frutos do mar, principalmente em pratos culinários do tipo moqueca (CUNHA, 2010), além do consumo de ostras *in natura*. Por se tratar de organismos filtradores, os moluscos bivalves concentram e digerem algas, bactérias e partículas presentes na água. Bem como contaminantes potencialmente nocivos, como toxinas e metais pesados, agentes patogênicos bacterianos e virais e representam alimentos de alto risco para a saúde humana (MORRISON et al., 2011).

Dentre os micro-organismos patogênicos envolvidos na contaminação de áreas onde se extraem os moluscos bivalves, se destaca a *Salmonella*, bactéria potencialmente patogênica, que se encontra amplamente distribuída na natureza. A contaminação do ambiente aquático por esse gênero bacteriano ocorre por meio de resíduos sólidos oriundos de humanos e animais (BUDIATI et al., 2013).

Salmonella é um bacilo não esporogênico, Gram-negativa, pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (HUR; JAWALE; LEE, 2012). Que tornou-se um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, como em

desenvolvimento, devido à sua ampla distribuição na natureza e seu caráter patogênico (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012). No Brasil, entre os anos de 1999 a 2008 foram relatados 119 surtos alimentares envolvendo diversos sorotipos de *Salmonella*, com maior prevalência para *S. Enteritidis* (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o sorotipo envolvido no processo inflamatório e com a competência dos sistemas de defesa do indivíduo afetado (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Segundo Oliveira et al. (2013) a virulência da bactéria está relacionada à combinação dos fatores cromossômicos e plasmidiais presentes nas ilhas de patogenicidade.

As ilhas de patogenicidade são responsáveis por codificarem genes de virulência responsáveis pela invasão, adesão e colonização do patógeno no hospedeiro (FORTES et al., 2012). Dentro os genes utilizados na pesquisa de virulência em isolados de *Salmonella* tem-se o gene *invA*, responsável pela produção de proteínas envolvidas no processo de invasão das células epiteliais, o gene *spvC*, relacionado à virulência plasmidial e o gene *pefA* que está ligado à virulência do plasmídeo codificado pela fímbria (OLIVEIRA et al., 2013).

Além da patogenicidade da *Salmonella*, o aumento no nível de resistência antimicrobiana nos micro-organismos tem se tornado motivo de preocupação (HUR; JAWALE; LEE, 2012), uma vez que o aumento da resistência dos micro-organismos tem afetado o quadro de infecção. A capacidade da bactéria em desenvolver mecanismo de resistência está relacionada à presença de genes de resistência antimicrobiana presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012).

Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias Gram - negativas está a inativação enzimática por meio da produção de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL), enzima que atua na quebra do anel betalactâmico central dos betalactâmicos e tem sido um dos mecanismos mais utilizados pelos micro-organismos (SANTOS, 2009).

Baseado nisso, esse trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo está apresentada a revisão de literatura, com abordagem aos temas relacionados à área de estudo, como a pesca artesanal e a mariscagem, ação

antrópica nas áreas estuarinas, extração de moluscos bivalves, Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's), o gênero *Salmonella* e os fatores de virulência e resistência antimicrobiana.

O segundo capítulo, em forma de artigo, apresenta os dados relacionados ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella*, enquanto o terceiro capítulo, também em forma de artigo, apresenta os resultados da sorotipagem e a pesquisa de genes de virulência e patogenicidade.

OBJETIVOS

GERAL

Verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em estirpes de *Salmonella* sp. isoladas de amostras de água e de moluscos bivalves pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

ESPECÍFICOS

- Realizar a sorotipagem dos isolados;
- Determinar a suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonella* sp. frente a diferentes antimicrobianos comerciais;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Avaliar a produção de Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL);
- Verificar a presença de genes de virulência *pefA*, *spvC* e *invA*.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura: A ação antrópica em áreas de extração de moluscos bivalves compromete a inocuidade dos alimentos

RESUMO

A pesca artesanal no estado da Bahia é uma atividade desenvolvida por homens e mulheres principalmente em comunidades ribeirinhas, que dela retiram o sustento da família. Em decorrência do crescimento demográfico desordenado e o grande fluxo de turistas em algumas cidades litorâneas, o nível de poluição nos ambientes aquáticos vem aumentando devido ao lançamento de resíduos sólidos, esgotos domésticos e industriais em áreas usadas para recreação e pesca. A poluição nestes ambientes além de comprometer a qualidade dos organismos presentes, faz com que a água e o pescado se tornem veiculadores de doenças. Uma das bactérias causadoras de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) é a *Salmonella*. Bactéria que é potencialmente patogênica e virulenta, causa desde um simples mal estar, com náuseas, dores de cabeça e abdominais, até mesmo a morte. A severidade da doença está ligada ao sorotipo da bactéria envolvido no surto bem como às condições do indivíduo, como idade e capacidade imunológica. Na maioria dos casos de salmonelose os sintomas são brandos, permitindo que os pacientes se recuperem rapidamente, sem procurar os centros de saúde. Nos últimos anos o aparecimento de cepas resistentes tem dificultado o tratamento clínico de infecções bacteriológicas, em virtude dos mecanismos de resistência adquiridos, como a troca de material genético e alteração na permeabilidade da membrana celular. Atualmente, as Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL), que são enzimas capazes de inativarem a ação de antimicrobianos pertencentes à classe dos betalactâmicos, tem chamado à atenção dos profissionais da área de saúde. Sendo assim, a resistência adquirida pelas bactérias constitui um problema mundial, uma vez que a *Salmonella* está envolvida em surtos de doenças alimentares em vários países.

Palavras-chave: pesca, moluscos bivalves, resistência antimicrobiana, virulência.

ABSTRACT

Artisanal fishery in Bahia state is performed by men and women especially in riverside communities. This activity is essential for the support of the family. As a result of a disordered population growth and a large tourists flow in some coastal cities, the level of pollution in aquatic environments is increasing. This occurs due to the release of solid waste and wastewater in areas used for recreation and fishing. The pollution in these environments endangers the quality of the organisms, thus the water and fishes becomes vehicles of diseases. One bacterium that causes food and waterborne diseases (FWD) is *Salmonella*. This is, potentially pathogenic and virulent and can lead to malaise, nausea, headaches and abdominal pain, even death. Disease severity is linked to the serotype of the bacteria involved in the outbreak and the conditions of the individual, for example, age and immune resistance. In most cases of salmonellosis symptoms are mild, allowing patients to recover quickly without seeking health centers. In recent years the emergence of resistant strains has hindered the clinical treatment of bacterial infections, according to the mechanisms of acquired resistance, as the genetic material exchange and changes in cell membrane permeability. Currently, the extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), enzymes capable of inactivating the action of antimicrobial agents belonging to the class of beta-lactams, is one of the mechanisms that has drawn the attention of health professionals. Thus, the acquired resistance by bacteria is a worldwide problem and *Salmonella* is involved in outbreaks in many countries.

Keywords: Fishing, bivalve mollusks, antimicrobial resistance, virulence.

1. A pesca artesanal no estado da Bahia

O estado da Bahia apresenta uma extensão litorânea de 1.188 km, representando 14,5% da costa brasileira, formado por 44 municípios e 347 comunidades que exploram a pesca extrativa (IBAMA, 2006).

A pesca artesanal é uma atividade caracterizada pela captura de diversas espécies aquáticas, realizada por pescadores que trabalham sozinhos ou juntamente com a família. Essa atividade é dividida em duas modalidades, a pesca realizada pelo homem e a mariscagem, realizada pelas mulheres, atividade voltada à extração de mariscos nas áreas de manguezais. A pesca artesanal possui a representatividade de 83,5% da atividade pesqueira desenvolvida no estado, e a sua prática se dá desde a capital até os municípios da região costeira, incluindo o recôncavo baiano até o sul do estado (SANTOS, 2013).

A produção pesqueira do Estado da Bahia, no ano de 2005, foi de aproximadamente 45.631,00 toneladas, sendo 70,6% de peixes, 26,7% de crustáceos e apenas 2,7% de moluscos (BRASIL, 2006). Já em 2010 a Bahia obteve uma produção nacional de pescado de 114.530 toneladas e em 2011, obteve uma produção de 102.052 toneladas de pescado (BRASIL, 2011; 2012).

A atividade de pesca na Bahia é realizada praticamente por embarcações de pequeno porte, movidas à vela, remo ou motor, representadas principalmente pelas canoas, botes a remo, barcos a vela e jangadas. A frota pesqueira baiana está distribuída entre a Baía de Todos os Santos, que abriga municípios como Salvador, Candeias, São Francisco do Conde e outras; a Baía de Camamu; e os municípios de Valença e Mucuri localizados no extremo-sul baiano (BRASIL, 2006).

Diante da grande extensão litorânea do estado do Bahia, serão enfatizados dois municípios, Valença e São Francisco do Conde, que foram objeto de estudo dessa pesquisa.

O município de Valença está localizado no Baixo Sul da Bahia, e possui uma extensão territorial de 1.192,614 km², com uma população de aproximadamente 96.287 habitantes (IBGE, 2010). No município, boa parte da população tem como principal atividade de trabalho a pesca e a mariscagem, devido à proximidade da cidade ao litoral e à grande extensão de manguezais presentes na região, sendo

o desenvolvimento dessas atividades um fator importante para a sustentação socioeconômica das comunidades (BRASÃO, 2011).

O município de São Francisco do Conde, localizado no Recôncavo Baiano, atingiu nos anos de 2008 a 2010 o maior Produto Interno Bruto (PIB) *per capita*, devido à produção de refino de petróleo na cidade. As principais atividades econômicas do município são a agricultura e a pesca. A pesca desenvolvida no município é de base familiar, sendo praticada de forma artesanal, voltada para a captura de peixes e mariscos, que são comercializados no município e cidades vizinhas (SANTOS, 2013).

2. Poluição das áreas estuarinas

Os estuários são ecossistemas com alta produtividade primária. A alta produtividade se dá pelo aporte de nutrientes associados às fontes de água doce e movimentação da maré. Este habitat abriga muitas espécies de peixes e crustáceos marinhos, servindo de berço para o desenvolvimento de larvas e alevinos (CAMPELLO, 2006).

Uma das principais fontes de contaminação do ambiente aquático se deve à degradação do ambiente decorrente da ação antrópica, como o lançamento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas. Este tipo de contaminação origina problemas na saúde pública, trazendo riscos à comunidade devido ao banho em áreas contaminadas e o consumo de organismos aquáticos, como ostras e sururu (EVANGELISTA-BARRETO; SOUSA; VIEIRA, 2008).

Devido ao crescimento demográfico desordenado, os estuários estão sendo utilizados como corpo receptor de resíduos sólidos prejudiciais ao homem e ao ambiente, colocando em risco o desenvolvimento sustentável dos organismos ali presentes (PEREIRA et al., 2010).

Dentre os micro-organismos envolvidos na contaminação do ambiente e dos mariscos, tem-se a *Salmonella* spp., bactéria patogênica, que se encontra amplamente distribuída na natureza, podendo ser inserida no ambiente aquático por meio de animais silvestres ou o descarte inadequado de resíduos sólidos humanos e de animais (BUDIATI et al., 2013).

Farias et al. (2010) ao estudarem água e moluscos bivalves no estuário do rio Ceará, em Fortaleza-CE relataram a ausência de *Salmonella* em todas as amostras de água e presença em 50% das amostras de moluscos bivalves. Este fato se deve ao mecanismo de filtração dos moluscos, onde as suas brânquias funcionam como um filtro, concentrando e digerindo algas, bactérias e detritos presentes na água. Desse modo, os moluscos bivalves são os organismos aquáticos que mais oferecem riscos a saúde pública, principalmente quando consumidos *in natura* (HENRIQUES et al. (2000); MORRISON et al. (2011)).

3. Moluscos bivalves

Os bivalves pertencem ao filo Mollusca, um grupo que inclui diversos animais em torno de 130.000 espécies, assim como os gastrópodes cefalópodes (lulas e polvos), entre outros. Os animais pertencentes à classe dos moluscos bivalves possuem as partes do corpo mole e protegido em um exosqueleto sob a forma de concha, composta por duas valvas calcárias (PEREIRA, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Os moluscos bivalves são espécies que se distribuem desde a água doce até a salgada, sendo as espécies marinhas mais utilizadas. Podem ser encontrados tanto fixos ao substrato como enterrados na areia. Os moluscos bivalves de maior interesse comercial para o consumo humano são encontrados nas zonas intermarés que possuem pouca profundidade. Possuem um importante papel na indústria, pois representam uma parte significativa da pesca nacional, tanto pela produção como pelo número de pessoas que dependem da captura e comercialização para a sua subsistência (TORRES, 2011).

3.1. Ostra (*Crassostrea* sp.)

As ostras do gênero *Crassostrea* spp. são hermafroditas. A maioria dos juvenis alcança a maturidade sexual antes de atingir os 30 mm, aproximadamente 120 dias após a fixação (LENZ, 2008).

A ostra pertencente à classe Bivalvia e possui grande capacidade em converter a produção primária do ambiente aquático em proteína animal. Isso ocorre devido ao mecanismo de filtração da água através de suas brânquias

(EVANGELISTA-BARRETO; SOUSA; VIEIRA, 2008). Estes animais filtram de 19 a 50 L de água por hora. Nas ostras, grande percentual das bactérias ingeridas sobrevive ao processo digestivo, devido à adaptação sofrida pelo micro-organismo ao ambiente marinho e ao uso do ambiente intestinal do hospedeiro como fonte nutricional (SANDE et al., 2013).

Estudos realizados por Morisson et al. (2011), demonstraram que as ostras possuem a capacidade de acumular contaminantes fecais três a 62 vezes mais, quando comparado ao ambiente onde elas se encontram.

3.2. Sururu (*Mytella* sp.)

O gênero bivalve *Mytella* contém uma variedade de espécies que vivem enterrados no sedimento, ancorados em pedras ou raízes das plantas estuarinas. As espécies desse gênero são de interesse para o biomonitoramento dos ambientes aquáticos, pois fornecem informações sobre as condições dos sedimentos estuarinos em que vivem (DAVID; FONTANETTI, 2005).

Os moluscos bivalves da família *Mytilidae* conhecidos popularmente como mexilhões tem sido alvo de pesquisas no Brasil, pois são organismos que servem como bioindicadores de poluição. Possuem importância ecológica e econômica, pois são fontes de alimento em muitos países em desenvolvimento (PEREIRA, 2011).

Assim como as ostras, os mexilhões também se alimentam por filtração, retendo em seus tecidos substâncias orgânicas, químicas e micro-organismos presentes na água (EVANGELISTA-BARRETO; SOUSA; VIEIRA, 2008).

4. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's)

Atualmente existem aproximadamente 250 tipos de doenças transmitidas por alimentos e, dentre elas, muitas são causadas por micro-organismos patogênicos, os quais são responsáveis por sérios problemas de saúde pública. As síndromes, resultantes da ingestão de alimentos contaminados pelos micro-organismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) ou simplesmente toxinfecções alimentares (OLIVEIRA et al., 2010).

A maioria dos casos de DTA's não é notificada, uma vez que na sua maioria apresentam sintomas brandos e a vítima não busca auxílio médico, nem informa as autoridades locais, como a vigilância sanitária (MARCHI et al., 2011).

No Brasil, a incidência de doenças transmitidas por frutos do mar não é bem conhecida e a maioria dos casos não são reportados. Entretanto, existem evidências de que o pescado e seus subprodutos se encontram no topo da lista de alimentos associados aos surtos de DTA's (VIEIRA et al., 2006). Nos Estados Unidos, as DTA's têm sido responsáveis por cerca de 76 milhões de doenças a cada ano, sendo o consumo de moluscos bivalves e outros frutos do mar responsáveis por 10 a 19% das doenças (DIEGO et al., 2013).

O consumo de organismos aquáticos originários de águas contaminadas pode levar ao aparecimento de DTA's que podem ser causadas tanto por um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido, como pela toxina por ele produzida (VIEIRA et al., 2008).

Entre os anos de 2000 a 2008 no Brasil, foram registrados, oficialmente, 15 casos de surtos alimentares: oito na Bahia, três em São Paulo, um no Amazonas, um no Maranhão, um em Sergipe e um no Rio Grande do Sul. Em 64% dos casos a contaminação ocorreu por meio do consumo de água contaminada, 7% por múltiplos alimentos e 7% pela ingestão de ostras cruas (CARVALHO, 2012).

5. *Salmonella*

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae* que caracteriza-se como bacilos Gram-negativos, mésofilos, anaeróbio facultativo, não esporogênico, sendo na maioria das espécies móveis, com flagelos do tipo peritríquios. Apresentam temperatura de crescimento na faixa de 35° a 37°C. São facilmente eliminadas com a pasteurização, sensíveis a baixo pH (4,5 ou inferior) e atividade de água (A_w) menor que 0,94 (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* ainda é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Esta nomenclatura reflete o entendimento atual da taxonomia da

Salmonella. O número atual de sorovares para cada uma das espécies e subespécies de *Salmonella* é de 2.610, onde 1.547 pertencem a *S. enterica* subsp. *entérica*, 513 a *S. enterica* subsp. *salamae*, 100 a *S. enterica* subsp. *arizonae*, 341 a *S. enterica* subsp. *diarizonae*, 73 a *S. enterica* subsp. *houtenae*, 13 a *S. enterica* subsp. *indica* e 23 a *Salmonella bongori* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A classificação e nomenclatura das salmonelas são baseadas no esquema de Kauffman-White que tem como base a soroaglutinação dos antígenos O (somática), H (flagelar) e Vi (capsular). Os antígenos “O” são organizados por algarismos arábicos (1, 2, 3...) e são responsáveis por caracterizarem os sorogrupos, os antígenos “H” são designados por letras minúsculas do nosso alfabeto, quando a bactéria está na fase 1 e por algarismos arábicos quando está na fase 2. Já o antígeno Vi de caráter polissacarídico é encontrado apenas em três sorovares de *Salmonella* (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*) (CAMPOS, 2005).

Mundialmente *Salmonella Enterica* tem sido um dos sorotipos mais envolvidos em surtos alimentares atribuídos ao consumo de alimentos de origem animal, ocasionando diversos internamentos e mortes (HUR; JAWALE; LEE, 2012). Acredita-se que mundialmente ocorram cerca de 93,8 milhões de casos de infecções, acarretando em 155 mil mortes por ano (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: a febre tifoide, causada por *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) e as salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Os sintomas incluem gastroenterite leve, náuseas e cefaléia. O período de incubação varia de seis a 72 horas (BUDIATI et al., 2013).

A maioria das pessoas que são acometidas por uma salmonelose se recupera sem tratamento específico, embora em casos em que a diarreia é severa, o paciente necessite de internamento e cuidados especiais, por meio de terapia antimicrobiana. Em outros casos, a bactéria poderá se espalhar na corrente sanguínea causando septicemia ou até mesmo a morte. Crianças, idosos

ou indivíduos com o sistema imunológico comprometidos são os mais vulneráveis a terem complicações (CDC, 2009).

Salmonella Enteritidis tem sido a principal causa de surtos em muitos países africanos, asiáticos, europeus e latino-americanos, sendo o segundo sorotipo mais comum na América do Norte e Oceania, representando 43,5% de todos os isolados de *Salmonella* (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

Nos Estados Unidos da América a Food and Drug Administration (FDA) relatou a presença de cepas de *Salmonella* em uma variedade de peixes, crustáceos e moluscos consumidos crus (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012). Dentre os vários sorotipos do gênero *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Heidelberg* tem sido os sorotipos mais envolvidos em surtos alimentares. A maioria das infecções está associada à ingestão de água contaminada, alimentos como ovos, frango, carne bovina, carne de porco, produtos lácteos, frutas e legumes (HUR; JAWALE; LEE, 2012).

6. Fatores de virulência

A patogenicidade é definida como a capacidade do micro-organismo causar doença. Os micro-organismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência. O mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* inclui inúmeros fatores de virulência, entre eles os mais importantes são as adesinas, invasinas e os fatores que inibem as defesas do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

As ilhas de patogenicidade em *Salmonella* (*Salmonella* Patogenicity Island - SPI) se constituem de grandes regiões cromossômicas (10 a mais de 100 Kb) responsáveis pela codificação de diversos fatores de virulência (VIEIRA, 2009).

As bactérias do gênero *Salmonella* possuem duas características marcantes na patogenia, a invasão do hospedeiro e a proliferação intracelular. Essas características estão relacionadas aos genes localizados nas SPIs, ou seja, elementos genéticos móveis e atributos que contribuem em mudanças no potencial de virulência das bactérias.

Atualmente, já foram descritas 17 SPIs, sendo algumas conservadas para o gênero e outras específicas para determinados sorotipos (OLIVEIRA et al., 2013).

1. SPI-1 - está presente em *S. bongori* e em todas as subespécies e sorovares de *S. enterica* analisadas até o momento;
2. SPI-2 - está ligada à capacidade de *S. enterica* sobreviver na célula fagocítica e se multiplicar nas vesículas das células eucarióticas;
3. SPI-3 - é responsável pelo sistema de transporte de alta afinidade com o Mg²⁺;
4. SPI-4 - seu papel na virulência ainda não está bem esclarecido. Favorece o contato íntimo da bactéria com as microvilosidades da membrana apical;
5. SPI-5 - se encontra ligada à enteropatogênese de *S. Dublin*;
6. SPI-6 - codifica diversos genes de virulência, embora o seu papel também ainda não esteja bem elucidado;
7. SPI-7 - *locus* específico para os sorotipos Typhi, Dublin e Paratyphi C. Sua estrutura em forma de mosaico compreende regiões implicadas na virulência;
8. SPI-8 - específica para *S. Typhi*, embora sua distribuição ainda não tenha sido investigada em detalhes;
9. SPI-9 - organização semelhante à SPI-4, codificando quatro genes e;
10. SPI-10 - codificam fimbrias, determinantes na especificidade do hospedeiro *S. Typhi* e Enteritidis;
11. SPI-11 - relacionada à sobrevivência da bactéria no interior do macrófago;
12. SPI-12 - codifica a proteína SspH2, auxiliando na polimerização da actina no interior da célula infectada;
13. SPI-13 - possui papel importante na patogenicidade de infecções causadas por *Salmonella Gallinarum*;
14. SPI-14 a SPI-17 - suas funções ainda não são bem conhecidas (FORTES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

As ilhas de patogenicidades presente nas salmonelas carregam um ou mais genes de virulência. O gene *spvC* é responsável pela regulação da liberação de citocinas em células infectadas e se encontra nos plasmídeos de virulência, região genômica altamente conservada. O locus *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) é composto por cinco genes *spvRABCD*. Outro gene de grande interesse em estudos desenvolvidos com *Salmonella* é o gene *invA* que está

presente na SPI-1, e altamente conservado em bactérias desse gênero. O operon *pef* (*Plasmid-encoded fimbriae*) é composto por quatro genes, *pefA*, *pefB*, *pefC* e *pefD*, se encontra em um plasmídeo de 90 Kb identificado em *Salmonella* Typhimurium (OLIVEIRA et al., 2013).

7. Resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas utilizados em tratamento de infecções, agem sobre micro-organismos inibindo o seu crescimento (bacteriostáticos) ou causando a sua destruição (bactericidas) (MOTA et al., 2010).

As diferentes classes de antimicrobianos possuem vários mecanismos de ação, como exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Classe dos agentes antimicrobianos e seu mecanismo de ação.

Classes	Antimicrobianos	Mecanismo de ação
	Ampicilina	Biossíntese da parede celular
	Cefalotina	Biossíntese da parede celular
Betalactâmicos	Imipinem	Biossíntese da parede celular
	Ceftazidima	Biossíntese da parede celular
Quinolonas	Ácido nalidixíco	Biossíntese de ácidos nucleicos
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	Inibição da DNA girase
Tetraciclina	Tetraciclina	Biossíntese de proteínas
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Biossíntese de proteínas

A resistência antimicrobiana ocorre devido ao grande número de antimicrobianos disponíveis e seus diferentes mecanismos de ação, assim como os diversos mecanismos de resistência apresentados pelos micro-organismos, incluindo a alteração por mutações do alvo antimicrobiano, alterações na permeabilidade da membrana celular e transferência horizontal de genes de resistência (OLIVEIRA; LIMA; MOURA, 2011; RODRÍGUEZ-ROJA et al., 2013).

A presença de resíduos de antimicrobianos no ambiente aquático também favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia

alimentar por meio de alimentos contaminados e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota indígena ou potencialmente patogênica aos humanos (CARNEIRO et al., 2007).

A resistência antimicrobiana em *Salmonella* caracteriza sério problema de saúde pública no mundo. A alta taxa de resistência ocorre devido à prescrição excessiva de antimicrobianos por parte de médicos, a forma incorreta de descarte dos antimicrobianos pela população e ao emprego das drogas em cultivos intensivos de animais, que embora seja a forma mais rápida de responder a uma determinada doença, pode causar um aumento na virulência dos patógenos (CARVALHO et al., 2009).

Diversas pesquisas têm alertado sobre o surgimento de cepas resistentes a diversos fármacos (HUR; JAWALE; LEE, 2012). O surgimento de salmonelas multirresistentes tem sido relacionado à utilização de antimicrobianos na produção animal (POPPE et al., 2006). A capacidade da bactéria em desenvolver mecanismo de resistência está relacionada à presença de genes de resistência antimicrobiana em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012).

Isolados bacterianos de organismos aquáticos originários da aquicultura nos Estados Unidos, Dinamarca, Noruega, Reino Unido e Canadá apresentaram perfil de resistência à ampicilina de 41,4% (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006), demonstrando que em ambiente de produção animal o uso de antimicrobianos induz à resistência das bactérias.

Salmonelas isoladas de frutos do mar no norte da Índia apresentaram perfil de resistência de 10% para a ampicilina (YAN et al., 2010) e de 76,92% à tetraciclina quando isoladas de lagos da Índia (ABHIROSH et al., 2011).

8. Concentração Inibitória Mínima – CIM

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um micro-organismo. A CIM é considerada como um "padrão" na determinação da susceptibilidade antimicrobiana. Esse teste é utilizado em laboratórios para a confirmação da resistência intermediária, assim como obter uma resposta diante de um resultado

não confiável ou quando o método de difusão de disco não é aplicável (ANDREWS, 2001).

Estudos realizados por Li et al. (2010) em bactérias ambientais oriundas do rio Xiao na China, obtiveram valores de CIM para a tetracilina de 128 µg/mL e 256 µg/mL para a ampicilina. Estes resultados sugerem a presença de resíduos de antimicrobianos no ambiente aquático, favorecendo o surgimento de cepas resistentes em decorrência da seletividade sofrida por estes micro-organismos nos ambientes hostis.

9. Betalactamases de Espectro Estendido – ESBL

As Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) são definidas como enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar o anel betalactâmico central dos betalactâmicos e são inativadas por inibidores específicos, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Atualmente, mais de 430 ESBL foram caracterizadas, havendo descrição de muitas delas no Brasil (SILVA, LINCOPAN, 2012; SANTOS, 2009).

No caso de *Salmonella* existem poucos relatos associados à ESBL quando comparados a outras bactérias da família das *Enterobacteriaceae*, embora nos últimos anos tenham sido observado um aumento na incidência de salmonelas com este mecanismo de resistência (UMA et al., 2010).

Em diferentes países da Europa, foram isoladas a partir de alimentos, amostras ambientais e animais silvestres, estirpes de *Salmonella* produtoras de ESBL (COQUE; BAQUERO; CANTON, 2008). Jure et al. (2010) relataram que no Brasil desde 2003, estirpes de *Salmonella* spp. isoladas em abatedouros de aves têm se mostrado resistente à cefotaxima, sugerindo a aquisição de ESBL em salmonelas de origem animal.

No Rio de Janeiro foram isoladas cepas de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL a partir de efluentes de origem hospitalar (SILVA, LINCOPAN, 2012). Korzeniewska e Harnisz (2013) analisando amostras de água em um rio que recebe lançamento de esgoto hospitalar relataram que em 33,3% das amostras havia estirpes de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL.

REFERÊNCIAS

ABHIROSH, C.; SHERIN, V.; THOMAS, A. P.; HATHA, A. A. M.; MAZUMDER, A. Potential public health significance of faecal contamination and multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* serotypes in a lake in India. **Public Health**, London, v. 125, p. 377-379, May, 2011.

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G.F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 780–788, June, 2012.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 48, p. 5-16, 2001.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 1103-1113, 2006.

BRASÃO, M. F. F. **Cotidiano e trabalho das marisqueiras e catadeiras de Valença-Ba (1960-2000)**. 2011. 134f. Dissertação (Mestrado em História Regional e Local). Universidade do Estado da Bahia.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento da Atividade Pesqueira no Litoral do Brasil – Projeto ESTATPESCA**. Tamandaré: Ministério do Meio Ambiente, 2006, p.328.

BRASIL. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2008-2009**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 2011. p. 101.

BRASIL. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 2012. p. 129.

BUDIATI, T.; RUSUL, G.; WAN-ABDULLAH, W. N.; ARIP, Y. M.; AHMAD, R.; THONG, K. L. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. **Aquaculture: an international journal devoted to fundamental aquatic food resources**, Amsterdam, v. 372–375, p. 127-132, Nov. 2013.

CAMPELLO, F. D. **A problemática da poluição por esgostos domésticos no sistema estuarino-lagunar Tramandaí-Armazen (RS, Brasil): física e química da água e a resposta dos macroinvertebrados bentônicos**. 2006. 194 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M. M.; FALCÃO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 254-264, July. 2012.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.Z.; Alterthum, F. (Org.). **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p.319-328.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R.M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 545-556, Nov. 2012.

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

CARVALHO, F. C. T. de. **Salmonella spp. e Escherichia coli em ambientes de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Ceará.** 2012. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais). Universidade Federal do Ceará, 2012.

CARVALHO, F. C. T. de; BARRETO, N. S. E; REIS, C. M. F. dos; HOFER, E; VIEIRA, R. H. S. dos F. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carcinoculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciências Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 549-556, Set. 2009.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. 2009. **Salmonellosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html>. Acesso em: 10 jan. 2014.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 47, p.1-11, Nov. 2008.

CUNHA, M. A. da. **Composição química e nutricional de preparações de origem africana, típicas da culinária baina.** 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia.

DAVID, J. A. de O.; FONTANETTI, C. S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. **Brazilian Journal of morphological Sciences**, São Paulo, v. 22, n.4, p. 203-210, 2005.

DIEGO, A. G. L.; RAMOS, A. P. D.; SOUZA, D. S. M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULARTA, J. A.; MORESCO, V.; AMSTUTZC, R. C.; MICOLI, A. H.; CANTUSIO NETO, R.; Barardi, C. R. M.; FRANCO, R. M. B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, p. 93-100, July. 2013.

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

FARIAS, M. F.; ROCHA-BARREIRA, C. A.; CARVALHO, F. C. T.; SILVA, C. M.;
REIS, E. M. F.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Condições microbiológicas de
Tagelus plebeius (Lightfoot, 1786) (Mollusca: Bivalvia: Solecurtidae) e da água no
estuário do Rio Ceará, em Fortaleza – CE. **Boletim Estatístico da Pesca**, São
Paulo, v. 36, n. 2, p. 135-142, Out. 2010.

FORTES, T. P.; FAGUNDES, M. Q.; VASCONCELLOS, F. A.; TIMM, C. D.;
SILVA, E. F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão.
Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 219-27, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFT, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo:
Atheneu. p. 182, 2006.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.;
BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Supplement 2003 e 2007 (No.
47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris,
v. 161, p. 26-29, Oct. 2010.

HENRIQUES, M. B.; ZAMARIOLI, L. A.; PEREIRA, O. M.; FAUSTINO, J. S.
Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna*
(LINAEUS, 1758) nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista, Estado de
São Paulo. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.33, p.69-79, 2000.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated
from food animals: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p.
819–830, May. 2012.

IBAMA. **Monitoramento da atividade pesqueira no litoral do Brasil - Projeto ESTATPESCA**: relatório final. Convênio SEAP/IBAMA/ FROZZE nº109/2004, Brasília, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sinopse do censo demográfico de 2010 na Bahia**. 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf=29&dados=1>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

JURE, M. A.; AULET, O.; TREJO, A.; CASTILLO, M. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Oranienburg (CTX-M-2 group) in a pediatric hospital in Tucumán, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 121-124, Mar-abr. 2010.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M.; Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**, London, v. 128, p. 904-911, July. 2013.

LENZ, T. de M. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia). Universidade Estadual de Santa Cruz.

LI, D.; YU, T.; ZHANG, Y.; YANG, M.; LI, Z.; LIU, M.; QI, R. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 11, p. 3444-3451, Apr. 2010.

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

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

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

OLIVEIRA, F. B. M.; LIMA, L. M.; MOURA, M. E. B. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, Teresina, v.4, n.4, p.72-77, Out-Nov-Dez. 2011.

OLIVEIRA, A.P. de.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MOREIRA, N.M.; OLIVEIRA, J.J.de. *Salmonella* Enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia biosfera. Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 6, p. 1947-1972, 2013.

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

OLIVEIRA, M. C. R. M. **Moluscos Bivalves em Portugal: Composição Química e Metais Contaminantes**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.

PEREIRA, M. D.; SIEGLE, E.; MIRANDA, L. B.; SCHETTINI, C. A. F.
Hidrodinâmica e transporte de material particulado em suspensão sazonal em um estuário dominado por maré: estuário de caravelas (BA). **Revista Brasileira de Geofísica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 427-444, Mar. 2010.

PEREIRA, A. F. **Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Salmonella* em moluscos bivalves e carne de siri na Baía do Iguape, Maragogipe, Bahia**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

POPPE, C.; MARTIN, L.; MUCKLE, A.; ARCHAMBAULT, M.; MCEWEN, S.; WEIR, E. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal, food products in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 70, p. 105-114, Oct. 2006.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 303, p. 293– 297, 2013.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J.L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 190-196, Mar. 2010.

SANTOS, M. D. F. **A pesca artesanal e a qualidade de pescados recém-capturados em comunidades de São Francisco do Conde-Ba**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia.

SANTOS, S. B. dos. Incidência de *Enterobactérias* produtoras de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL) em um Hospital do Município de Duque de Caxias-

RJ. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 41, n.4, p. 251-255, 2009.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio.

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

TORRES, J. P. M. P. **Efeito de diferentes temperaturas de armazenamento na qualidade de moluscos bivalves vivos**. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

UMA, B.; PRABHAKAR, K.; RAJENDRAN, S.; SARAYU, Y. L. Prevalence of extended spectrum beta lactamases in *Salmonella* species isolated from patients with acute gastroenteritis. **Indian Journal of Gastroenterology**, India, v.29, p. 201–204, Sept. 2010.

VIEIRA, D. M.; NAUMANN, C. R. C.; ICHIKAWA, T.; CÂNDIDO, L. M. B. Características microbiológicas de carne de siri beneficiada em antonina (PR) antes e após a adoção de medidas de boas práticas. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.7, n.1-2, p.41-48, 2006.

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

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

YAN, H.; LI, L.; ALAM, M. J.; SHINODA, S.; MIYOSHI, Shin-ichi.; SHI, L.
Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern
China. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, p. 230–
234, 2010.

CAPÍTULO 2

Veiculação de *Salmonella* sp. resistente aos antimicrobianos em moluscos bivalves e áreas estuarinas, Bahia, Brasil

Este artigo será submetido à revista Caatinga.

VEICULAÇÃO DE *Salmonella* sp. RESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS EM MOLUSCOS BIVALVES E ÁREAS ESTUARINAS, BAHIA, BRASIL

Carla Silva da Silveira; Norma Suely Evangelista-Barreto; Oscarina Viana de Sousa

RESUMO - Nos últimos anos o surgimento de patógenos resistentes tem dificultado o tratamento de infecções bacteriológicas, tanto na produção animal como na área médica, em decorrência da aquisição de mecanismos de resistência pelos micro-organismos. O objetivo do estudo foi traçar o perfil de resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* sp. presentes em moluscos bivalves (ostras e sururu) e áreas estuarinas em duas regiões da Bahia, Brasil. Um total de 27 cepas previamente isoladas foram testadas, sendo 12 provenientes de moluscos bivalves e 15 da água. Para a suscetibilidade antimicrobiana foram utilizados oito agentes antimicrobianos pertencentes as classes fenicóis, betalactâmicos, tetraciclina, quinolonas e fluoroquinolonas, bem como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a produção de Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL). Os isolados apresentaram perfil de suscetibilidade de 100% para as classes fenicóis e fluoroquinolona, 88,3% para a tetraciclina e betalactâmicos e 77,7% para as quinolonas. A resistência bacteriana era de origem cromossômica, enquanto o índice de multirresistência (MAR) entre os isolados de sururu in natura foi de 0,25. A CIM encontrada foi de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 350 µg/mL para o ácido nalidixíco, ampicilina e tetraciclina, respectivamente. Nenhum dos isolados apresentaram produção de ESBL. A presença de *Salmonella* sp. multirresistente e com elevada CIM está sendo veiculada em áreas de extração de moluscos bivalves no estado da Bahia, Brasil.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Multiresistência. Segurança dos alimentos. Betalactamases.

RELEASE OF *SALMONELLA* SP. ANTIMICROBIAL RESISTANT FROM BIVALVE MOLLUSKS IN ESTUARY AREAS, BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT - In recent years the emergence of resistant pathogens has complicated the treatment of bacterial infections in animal production as well as in the medical field due to the acquisition of resistance mechanisms by microorganisms. The objective of the study was to delineate the antimicrobial resistance profile in *Salmonella* strains isolated from bivalve molluscs (oysters and mussels) and estuarine areas in two regions of Bahia, Brazil. A total of 27 strains, 12 isolated from bivalve mollusks and 15 from estuarine water were tested. For antimicrobial susceptibility eight antimicrobial agents belonging to phenicol, beta-lactams, tetracyclines, quinolones and fluoroquinolones classes were used as well as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the extended - spectrum beta-lactamases (ESBL) production. Isolates showed a profile of 100% of susceptibility for phenicol and fluoroquinolones, 88.3% to tetracycline and beta-lactams and 77.7% for quinolones. Bacterial resistance was characterized as potentially chromosomal origin while the rate of multidrug resistance (MDR) among mussels isolates in nature was 0.25. The MIC was 100 µg/mL, 500 µg/mL and 350 µg/mL to nalidixic acid, ampicillin and tetracycline, respectively. None of the isolates showed ESBL production. The presence of *Salmonella* sp. multidrug-resistant and high MIC has been conveyed in extraction sites bivalve molluscs in Bahia state, Brazil.

Keywords: Antimicrobial. Multidrug resistance. Food safety. Betalactamases.

INTRODUÇÃO

Salmonella não tifóide é um importante patógeno de origem alimentar que pode causar gastroenterite e septicemia em humanos. Os alimentos de origem animal desempenham um importante papel como reservatório primário de *Salmonella*, embora em humanos as infecções sejam consequência quase sempre de alimentos contaminados com a bactéria (LAI et al., 2014).

Em moluscos bivalves, que apresentam um sistema de alimentação por filtração, a concentração de alta carga microbiana nos tecidos coloca esse alimento em uma classe de risco para o consumo (AMAGLIANI et al., 2012), uma vez que são muito apreciados na forma *in natura*.

As ostras são capazes de concentrar em seus tecidos cerca de três a 62 vezes mais contaminantes do que o ambiente onde se encontram (MORRISON et al., 2011). Dentre os micro-organismos patogênicos envolvidos na contaminação do ambiente, *Salmonella* sp. se destaca por se encontrar amplamente distribuída na natureza, podendo ser inserida no ambiente aquático por meio do descarte inadequado de resíduos sólidos de origem humana e animal (BUDIATI et al., 2013).

O gênero *Salmonella* compreende mais de 2.610 diferentes sorotipos (GUIBOURDENCHE et al., 2010). *Salmonella* Enteritidis tem sido a principal causa de surtos em muitos países africanos, asiáticos, europeus e latino-americanos, sendo o segundo sorotipo mais comum na América do Norte e Oceania, representando 43,5% de todos os isolados de *Salmonella* (CAMPIONI et al., 2012).

No Brasil, a incidência de doenças transmitidas por frutos do mar não é bem conhecida e a maioria dos casos não são reportados. Entretanto, existem evidências de que o pescado e seus subprodutos se encontram no topo da lista de alimentos associados aos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) (OLGUNOGLU, 2012). Nos Estados Unidos, as DTA's têm sido responsáveis por cerca de 76 milhões de doenças a cada ano, sendo o consumo de moluscos bivalves e outros frutos do mar responsáveis por 10 a 19% das doenças (DIEGO et al., 2013).

Além da patogenicidade da *Salmonella*, diversas pesquisas têm alertado sobre o surgimento de cepas resistentes aos diversos antimicrobianos comerciais (HUR et al., 2012). O surgimento de salmonelas multirresistentes tem sido relacionado à prescrição nem sempre criteriosa ou racional de antimicrobianos por parte dos agentes da saúde bem como o emprego dessas drogas nos cultivos de animais (POPPE et al., 2006).

Os antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* são os da classe das fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração (ASLAM et al., 2012). Dentre os diversos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias Gram-negativas, tem-se a inativação enzimática por meio da produção de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL), enzima que atua na quebra do anel central dos betalactâmicos, impossibilitando a atividade antimicrobiana dos antimicrobianos desta classe, tornando-se um dos maiores problemas mundiais na área médica, principalmente em ambiente hospitalar (SANTOS, 2009).

Apesar de existirem poucos relatos de ESBL associados à *Salmonella* quando comparados a outras bactérias da família Enterobacteriaceae, em alguns países da Europa já foram isoladas estirpes de *Salmonella* produtoras de ESBL a partir de alimentos, amostras ambientais e animais silvestres (COQUE et al., 2008).

A região costeira do estado da Bahia merece atenção quando se trata de problemas ambientais, devido à sua importância turística, extensão litorânea e regiões de manguezais, que servem de fonte de sustentação para as populações ribeirinhas. No baixo sul da Bahia, o município de Valença é muito procurado devido ao seu complexo turístico, famoso por suas ilhas paradisíacas como Morro de São Paulo e Boipeba. Com isso, o município vem sofrendo com a especulação imobiliária, projetos industriais e atividades agropecuárias (PEREIRA et al., 2010). Situação semelhante vem ocorrendo nos municípios que formam a região metropolitana de Salvador, como as cidades de Candeias, Madre de Deus, São Francisco do Conde e demais localidades (BRANDÃO, 2007).

O consumo significativo de frutos do mar na Bahia se deve à culinária baiana, principalmente em pratos do tipo moqueca e casquinha de siri, além do

consumo de ostras *in natura*. O acúmulo de patógenos resistente aos antimicrobianos comerciais nos tecidos dos moluscos bivalves tende a veicular *Salmonella* ao homem por meio da cadeia alimentar.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. isoladas de moluscos bivalves e áreas estuarinas, frente a diferentes antimicrobianos comerciais, bem como verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a capacidade de produção de ESBL.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram previamente isoladas de moluscos bivalves e áreas estuarinas em duas regiões do estado da Bahia, São Francisco do Conde (SFC), localizado no Recôncavo da Bahia e Valença, localizada no baixo sul da Bahia. Foram utilizadas 27 cepas de *Salmonella* sp., sendo 12 cepas provenientes de moluscos bivalves e 15 cepas de água estuarina (Tabela 1). As cepas se encontravam armazenadas a 5° C em agar nutriente, no acervo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

Tabela 1. Descrição das cepas de *Salmonella* sp. de acordo com o local e fonte de isolamento.

Código	Local	Fonte
AL1, AL2, AL4, AL5, AL6	SFC	Sururu <i>in natura</i>
AL3, AL7	SFC	Ostra
AL8, AL9	SFC	Sururu processado
AL11, AL12, AL13	Valença	Ostra
AG2, AG3	Valença	Água
AG1, AG4, AG5, AG6, AG7, AG8, AG9, AG10, AG11, AG12, AG13, AG14, AG15, AG16	SFC	Água

AL – alimento. AG – água. SFC – São Francisco do Conde.

Para o teste de suscetibilidade antimicrobiana foi utilizado o método de difusão em disco descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI,

2011). Foram selecionados oito agentes antimicrobianos pertencentes às classes dos Belalactâmicos: ampicilina – AMP (10 µg); cefalotina – CFL (30 µg); imipinem – IMP (10 µg) e ceftazidima – CAZ (30 µg); Quinolona: ácido nalidíxico – NAL (30 µg) e ciprofloxacina – CIP (5 µg); Fenicol: cloranfenicol – CLO (30 µg) e Tetraciclina: tetraciclina – TET (30 µg).

A partir de culturas crescidas em agar tripton de soja (TSA) a 37° C por 24 horas, obteve-se um inóculo com concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland (10^7 - 10^8 UFC/mL). Com um *swab* estéril realizou-se o espalhamento do inóculo em placas de agar Muller-Hinton. Os discos impregnados com os antimicrobianos foram dispostos a uma distância de 20 a 25 mm entre si, a fim de evitar a sobreposição das zonas de inibição. As placas foram incubadas a 37° C por 18/24 horas. Os isolados foram definidos como sensíveis, intermediários ou resistentes de acordo com o limite de leitura do diâmetro para Enterobacteriaceae (CLSI, 2011).

O Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) foi calculado e interpretado de acordo com a fórmula: a/b , onde, a - número de antimicrobianos aos quais o isolado apresentou resistência e b - número total de antimicrobianos aos quais os isolados foram expostos (ADZITEY et al., 2012).

Para as cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), segundo a técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (CLSI, 2011).

As cepas que apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados foram submetidas à técnica de cura plasmidial utilizando caldo Luria-Bertani (LB) e o agente mutagênico alaranjado de acridina (AC) na concentração de 100 µg/mL (MOLINA-AJA et al., 2002). As cepas foram incubadas em caldo LB+AC a 37° C por 24 horas, e posteriormente submetidas novamente ao teste de antibiograma frente aos antimicrobianos aos quais apresentaram resistência.

Os isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos da classe dos betalactâmicos foram submetidos à detecção de ESBL por meio do teste de aproximação de disco (CLSI, 2011). Para o teste foi utilizada uma placa contendo agar Muller-Hinton previamente inoculada com a cepa de interesse (10^7 - 10^8

UFC/mL). Em seguida, foi colocado no centro da placa um disco de amoxicilina/ácido clavulânico e ao redor discos impregnados com ampicilina (10 µg), que serviam como marcadores, a uma distância de 30 mm do disco central. As placas foram incubadas a 37° C por 18 horas e a formação de uma zona de sinergismo entre o disco central e o antimicrobiano marcador foi considerado positivo para presença de ESBL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de suscetibilidade das salmonelas foi de 100% para os fenicóis e fluoroquinolona, 88,3% para a tetraciclina e betalactâmicos e 77,7% para a quinolona (Figura 1). Resultados semelhantes foram relatados por Abhirosh et al. (2011), para a ciprofloxacina (fluoroquinolona) e o cloranfenicol (cloranfenicol) em *Salmonella* isoladas em amostras de água doce na Índia.

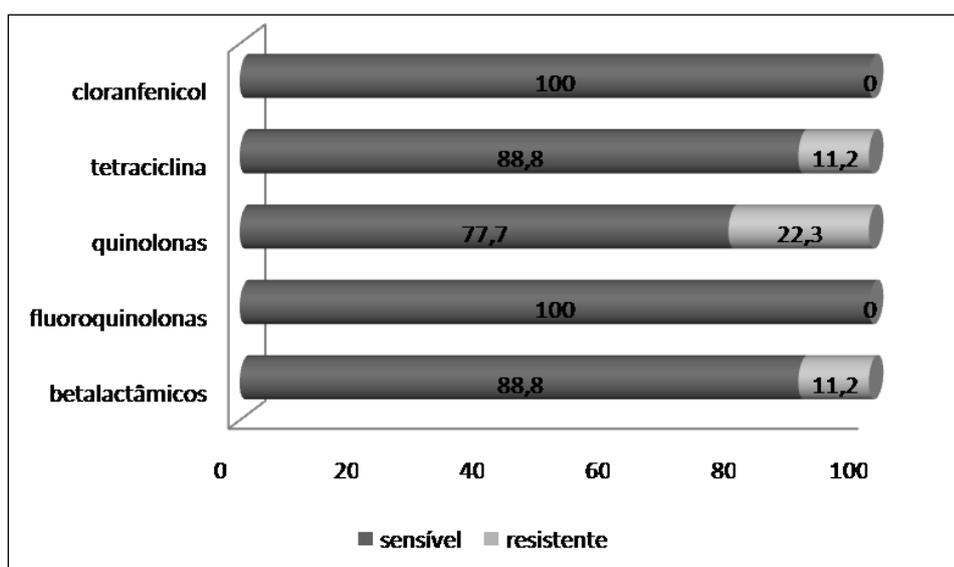


Figura 1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonella* sp. para as diferentes classes de antimicrobianos testados.

Maior perfil de resistência foi observado para o ácido nalidíxico com 22,3%. O ácido nalidíxico é uma quinolona muito utilizada no combate às doenças urinárias em humanos e animais (CAMPIONI et al., 2012), devido a sua eficiência contra a maioria das Enterobacteriaceae (SILVA; HOLLENBACH, 2010).

Quando parte da carga residual dos antimicrobianos de uso humano e animal são liberados diretamente nas águas superficiais e se acumulam no sedimento, altera o equilíbrio ecológico natural, desencadeando um aumento de bactérias resistentes no ambiente (REGITANO; LEAL, 2010). A presença destes compostos no ambiente aquático tem chamado atenção, pois representam um risco para os ecossistemas, mesmo quando encontrados em baixas concentrações, pois os antimicrobianos são projetados para inativarem ou destruírem os micro-organismos, tendo assim um impacto significativo nos processos controlados por comunidades biológicas indígenas (HUERTA et al., 2013).

Outro fator que contribui para a resistência ao ácido nalidíxico é a redução na suscetibilidade a outros agentes antimicrobianos, como à ciprofloxacina (quinolona de 2ª geração) (SOUZA et al., 2010), embora resistência a este fármaco não tenha sido observada no presente estudo.

A resistência à tetraciclina (11,2%) (Figura 1) estar relacionada ao aumento e ao uso excessivo desse antimicrobiano na medicina veterinária, tratamentos ou profilaxia na aquicultura (CARNEIRO et al., 2007) e por ser o fármaco de segunda escolha no tratamento de infecções bacterianas na medicina humana (CONCEIÇÃO et al., 2007). O aumento da resistência à tetraciclina é relacionado à presença de genes de resistência encontrados em plasmídeos e também pela aquisição e expressão de bombas de efluxo que reduzem os níveis tóxicos do antimicrobiano nas células bacterianas (HUR et al., 2012).

A presença de bactérias resistentes no ambiente também ocorre devido à liberação final dos antimicrobianos em corpos d'água, uma vez que parte do antimicrobiano é absorvido pelo organismo e outra parte é excretada na urina. A falta de saneamento básico nos municípios faz com que estes resíduos cheguem até os rios e estuários (BILA; DEZOTTI, 2003).

A disposição final dos efluentes nos cursos d'água ou o aproveitamento agrícola do efluente ou do lodo como fertilizantes orgânicos também podem representar importante fonte de exposição do ambiente a ampla gama de antimicrobianos de uso humano e animal (REGITANO; LEAL, 2010).

A resistência observada à classe dos betalactâmicos (11,2%) (Figura 1) está relacionada aos diferentes mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microorganismos contra a ação dessas drogas. Dentre estes, tem-se a capacidade das bactérias hidrolisarem os antimicrobianos pela produção das enzimas betalactamases, modificação das proteínas de ligação à penicilina, presença de bombas de efluxo ou alterações na permeabilidade da membrana celular (HUR et al., 2012). Visto que nesse trabalho os isolados não apresentaram produção de enzimas betalactamases, sugere-se que a resistência observada estar relacionada a pressão antrópica, uma vez que no entorno da área de estudo encontram-se diversas comunidades litorâneas.

Evangelista-Barreto et al. (2012), ao estudarem cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado no mercado municipal de Cruz das Almas-BA, relataram resistência a ampicilina em 12,5% (1/8) dos isolados. Segundo os autores o uso rotineiro desse antimicrobiano no tratamento de infecções em humanos tem contribuído para a resistência ao fármaco. Abhirosh et al. (2011), ao analisarem o perfil de resistência em *Salmonella* isoladas de água doce na Índia, também relataram resistência de 65,38% (17/26) para a ampicilina. Segundo os autores a presença de estirpes de *Salmonella* multirresistentes em águas doces é um problema de saúde para a população local, uma vez que esta bactéria se encontra envolvida em surtos relacionados ao consumo de água contaminada.

De acordo com a Tabela 2, 33,3% (9/27) dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos oitos antimicrobianos testados, sendo 04 (14,8%) provenientes da água do estuário de São Francisco do Conde e 03 (11,1%) oriundos do sururu *in natura*. Resistência intermediária foi observada em apenas 3,7% dos isolados para o ácido nalidíxico, sendo um isolado de sururu processado (SFC) e um da água do estuário de Valença.

Tabela 2. Ocorrência de resistência, múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e resistência plasmidial em cepas de *Salmonella* sp. isoladas de moluscos bivalves e áreas estuarinas, em duas regiões da Bahia, Brasil.

Local	Amostras	Nº de isolados	Resistência	Percentual de resistência (%)	MAR	Resistência plasmidial
	Sururu <i>in natura</i>	3	AMP, TET	11,1	0,25	NA
SFC	Sururu processado	1	NAL*	3,7	-	NA
	Água	4	NAL	14,8	-	NA
Valença	Água	1	NAL*	3,7	-	NA
Total		9	-	33,3	-	0%

SFC – São Francisco do Conde. AMP – ampicilina, TET – tetraciclina, NAL – ácido nalidíxico. *cepas com perfil de resistência intermediária. NA – Não apresentaram resistência mediada por plasmídeo.

A pressão seletiva no ambiente faz com que as bactérias entrem em contato com a microbiota indígena e por meio de trocas genéticas horizontais contribuem para a propagação da resistência aos antimicrobianos ao longo da cadeia alimentar (LUPO et al., 2012).

O ácido nalidíxico foi o único antimicrobiano que apresentou resistência intermediária (7,4%) (Tabela 2). Cepas que apresentam este perfil devem ser consideradas resistentes, uma vez que o uso deste antimicrobiano desencadeia um processo de seleção das estirpes resistentes (CORTEZ et al., 2006). Carvalho et al. (2009) ao testarem 23 cepas de *Salmonella* isoladas em fazendas de carcinicultura no estado do Ceará, relataram resistência intermediária ao ácido nalidíxico e a gentamicina em 4% dos isolados, sugerindo a ocorrência de resistência cruzada entre os fármacos.

Os isolados de São Francisco do Conde apresentaram maior perfil de resistência antimicrobiana, água (14,8%) e sururu *in natura* (11,1%), além de multirresistência (MAR 0,25) aos antimicrobianos ampicilina e tetraciclina (Tabela

2). Perfil de multirresistência foi verificado apenas nos isolados provenientes de sururu *in natura*. Este fato estar associado ao processo de filtração e bioacumulação dos micro-organismos nos tecidos dos animais. O sururu é um molusco que se encontra enterrado no sedimento e como os resíduos de antimicrobianos se acumulam no sedimento, este é submetido a uma exposição maior quando comparado aos resíduos suspensos na água.

Budiate et al. (2013), ao estudarem cepas de *Salmonella* isoladas em amostras de bagres e tilápias provenientes de mercados e lagos na Malásia relataram índice MAR variando de 0,18 a 0,46. Segundo os autores os isolados tiveram origem em ambientes onde os agentes antimicrobianos são frequentemente utilizados em tratamentos terapêuticos ou como promotores de crescimento.

O município de São Francisco do Conde, onde os isolados apresentaram maior índice de resistência, possui comunidades próximas ao estuário e devido à falta de saneamento básico na região, os dejetos produzidos nas residências são lançados diretamente no estuário. Outro fator que pode contribuir para a presença de bactérias resistentes é a criação de porcos e aves nos quintais das residências. O contato direto dos animais com o estuário favorece a disseminação de bactérias patogênicas de origem animal para os homens. De acordo com relatos da população local as fábricas localizadas no entorno do município despejam seus resíduos diretamente no estuário. Esta ação contribui para o desequilíbrio ecológico no meio aquático, afetando a cadeia produtiva.

Em todos os isolados resistentes não foi observada resistência mediada por plasmídeos (Tabela 2). A transferência de genes que confere à bactéria resistência cromossômica ocorre com menor frequência, tendo assim um menor impacto clínico quando comparado a resistência plasmidial (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2012). A resistência cromossômica depende de mutação espontânea, evento que ocorre com baixa frequência, e normalmente é dirigida a um só fármaco, embora bactérias sensíveis possam receber genes cromossômicos mutantes de bactérias já resistentes por meio da recombinação gênica (VASCONCELOS et al., 2010). O DNA cromossômico é mais estável,

enquanto o DNA plasmidial é facilmente transferido de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana (NEVES et al., 2007).

Todos os isolados apresentaram uma elevada CIM a ampicilina, tetraciclina e ao ácido nalidíxico. No caso da tetraciclina a resistência foi 22 vezes maior que o limite estabelecido pelo CLSI (2011), seguido da ampicilina com 15 vezes e o ácido nalidíxico com três vezes (Tabela 3).

Tabela 3. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cepas de *Salmonella* sp. isoladas em amostras de moluscos bivalves e água estuarina em duas regiões da Bahia, Brasil.

Código	Origem	CIM (µg/mL)		
		TET	AMP	NAL
AL1	Moluscos	350	500	-
AL2	Moluscos	350	500	-
AL4	Moluscos	350	500	-
AL9	Moluscos	-	-	100
AG3	Água	-	-	100
AG4	Água	-	-	100
AG13	Água	-	-	100
AG15	Água	-	-	100
AG18	Água	-	-	100
Padrão CLSI (2011)		≥16 µg/mL	≥32 µg/mL	≥32 µg/mL

AMP – ampicilina. TET – tetraciclina. NAL – ácido nalidíxico. CIM - Concentração Inibitória Mínima

Bactérias oriundas da água do rio Xiao na China apresentaram valores de CIM de 128 µg/mL a 256 µg/mL para a tetraciclina e ampicilina, respectivamente (LI et al., 2010), valores inferiores ao observado no presente trabalho.

Na literatura são poucos os trabalhos que relatam os valores da CIM para bactérias ambientais, não havendo uma padronização de metodologia que estipule limites para as bactérias de origem aquática, somente para estirpes clínicas. Diversas fontes de variação podem interferir nos valores da CIM para um determinado antimicrobiano, tais como a forma de diluição da droga, o tipo de meio de cultura utilizado, a padronização do inóculo bacteriano e a temperatura de incubação (PEREIRA JÚNIOR et al., 2006).

Nenhuma das culturas apresentou positividade para a produção de ESBL. Este fato pode estar relacionado à origem dos isolados, uma vez que poucos estudos relatam à presença de *Salmonella* produtora de ESBL em isolados de ambiente aquático ou alimentos.

Micro-organismos como *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. produtoras de ESBL foram relatados por Tação et al. (2014) a partir de amostras de água em rios de Portugal. Korzeniewska e Harnisz (2013), ao analisarem amostras de água de um rio que recebe lançamento de esgoto hospitalar, relataram que em 33,3% das amostras havia presença de cepas de Enterobacteriaceae produtora de ESBL. No Rio de Janeiro, Brasil, também foi isolado cepas de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL a partir de efluentes de origem hospitalar (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Outro fato que também tem contribuído para o aparecimento de bactérias produtoras de ESBL é a produção animal. No Brasil, desde 2003, estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves e resistentes à cefotaxima têm sido consideradas potencialmente produtores de ESBL (JURE et al., 2010).

As salmonelas não são boas produtoras de ESBL, porque ao contrário de outras Enterobacteriaceae necessitam de um cromossomo constitutivo para a produção de betalactamases. Este fato afeta a manutenção biológica do micro-organismo, uma vez que o elevado nível de expressão destas enzimas é incompatível com a invasão e multiplicação intracelular da bactéria (GARCÍA et al., 2010).

Apesar da incidência de bactérias com produção de ESBL ser maior na área clínica é importante realizar o monitoramento de cepas veiculadas em alimentos e água devido à troca de material genético entre as estirpes resistentes e os micro-organismos da microbiota do hospedeiro ou do ambiente (SILVA; LINCOPAN, 2012).

CONCLUSÃO

As salmonelas veiculadas em áreas de extração de moluscos bivalves em Valença e São Francisco do Conde apresentam baixa resistência antimicrobiana, sem a produção de ESBL. Entretanto, considerando a reconhecida

patogenicidade de bactérias do gênero de *Salmonella*, a detecção de cepas com padrões de resistência a antimicrobianos de uso clínico serve de alerta para as agências de saúde pública e para os consumidores desse tipo de pescado, principalmente pela prática do consumo *in natura* ou submetidos a processo térmico brando.

REFERÊNCIAS

ABHIROSH, C. et al. Potential public health significance of faecal contamination and multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* serotypes in a lake in India. **Public Health**, London, v. 125, p. 377-379, 2011.

ADZITEY, F.; RUSUL, G.; HUDA, N. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* serovars in ducks, duck rearing and processing environments in Penang, Malaysia. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 947-952, 2012.

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 780-788, 2012.

ASLAM, M. et al. Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 110-117, 2012.

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

BRANDÃO, M. A. Os vários recôncavos e seus riscos. **Revista do Centro de Artes, Humanidades e Letras**, Cachoeira, v.1, n. 1, p. 53-56, 2007.

BUDIATI, T. et al. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*)

obtained from wet markets and ponds in Malaysia. **Aquaculture: an international journal devoted to fundamental aquatic food resources**, Amsterdam, v. 372–375, p. 127–132, 2013.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M. M.; FALCÃO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 254-264, 2012.

CARNEIRO, D. O. et al. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 869-876, 2007.

CARVALHO, F. C. T. et al. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. 2011. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CONCEIÇÃO, R. C. S. et al. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p 31-34, 2007.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveillance**, Stockholm v. 13, p. 1-11, 2008.

CORTEZ, A. L. L. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 157-163, 2006.

DIEGO, A. G. L. et al. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, Newark, v. 72, p. 93-100, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

GARCÍA, C. S.; GÁNDARA, M. P.; GARCÍA, F. J. C. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Espanha, v. 28(Supl.1), p. 12-18, 2010.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 26-29, 2010.

HUERTA, B. et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 456–457, p. 161–170, 2013.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 819-830, 2012.

JURE, M. A. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Oranienburg (CTX-M-2 group) in a pediatric hospital in Tucumán,

Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 121-124, 2010.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**, London, v. 128, p. 904-911, 2013.

LAI, J. et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandog province of China, 2009 and 2012. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.180, p.30-38, 2014.

LI, D. et al. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 11, p. 3444-3451, 2010.

LUPO, A.; COYNE, S.; BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic 437 resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.3, p. 1-13, 2012.

MOLINA-AJA, A. et al. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 213, p. 7-12, 2002.

MORRISON, C. M. et al. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, p. 93-98, 2011.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

OLGUNOGLU, İ. A. *Salmonella* in Fish and Fishery Products. In: *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. p. 91-105. 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs/26424.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

PEREIRA, M. D. et al. Hidrodinâmica e transporte de material particulado em suspensão sazonal em um estuário dominado por maré: estuário de Caravelas (BA). **Revista Brasileira de Geofísica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 427-444, 2010.

PEREIRA JÚNIOR, D. J. et al. 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.

POPPE, C. et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal, food products in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 70, p. 105-114, 2006.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, p. 601-616, 2010.

SANTOS, S. B. Incidência de *Enterobactérias* produtoras de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL) em um Hospital do Município de Duque de Caxias-RJ. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 251-255, 2009.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p.363-369, 2010.

SOUZA, R. B. et al. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 497-500, 2010.

TACÃO, M. et al. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL – producers from aquatic systems. **Water Research**, New York, v. 48, p. 100-107, 2014.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2010.

CAPÍTULO 3

Identificação e pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* isoladas de água e de moluscos bivalves

Artigo a ser submetido à revista African Journal of Microbiology Research.

Identificação e pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* isoladas de água e de moluscos bivalves

C. S. Silveira¹, N. S. Evangelista-Barreto^{1*}, I. P. Silva¹, C. S. Carneiro¹ e O. V. Sousa²

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, Bahia 44380-000, Brasil

²Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Avenida da Abolição, 3207, Fortaleza, Ceará 60165-081, Brasil

Por se encontrarem presentes em ambientes poluídos, devido o lançamento de esgotos domésticos e industriais, os moluscos bivalves são considerados alimentos de risco, pois acumulam em seus tecidos contaminantes presentes no ambiente. Este trabalho teve como objetivo indentificar e pesquisar genes de virulência em cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de água e de moluscos bivalves. Foram utilizadas nove estirpes de *Salmonella*, sendo cinco isoladas de moluscos bivalves e quatro de água de estuário. A identificação dos sorotipos se deu por meio de triagem bioquímica e sorotipagem. A pesquisa dos genes de virulência *invA* (invasão), *pefA* (virulência do plasmídeo codificado pela fímbria) e *spvC* (virulência plasmidial) foi realizado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As cepas de *Salmonella* foram identificadas como pertencentes aos sorovares, *S. Saintpaul* (1), *S. Typhimurium* (2), *S. Albany* (4) e *S. Montevideo* (2). A presença do gene *invA* foi identificado em 44,4% (4/9) dos isolados em três diferentes sorotipos, *S. Montevideo*, *S. Albany* e *S. Typhimurium*. O gene *pefA* foi detectada em 22,2% (2/9) dos isolados, *S. Typhimurium* e *S. Albany*, enquanto o gene *spvC* não foi observado em nenhum dos isolados. Dentre os sorotipos identificados, a presença de *S. Typhimurium* é preocupante por ser o segundo sorotipo mais envolvido em surtos alimentares, enquanto a presença dos genes *invA* e *pefA* aumentam a capacidade de virulência da bactéria.

Palavras-chave: sorotipagem, virulência, ilhas de patogenicidade.

* Autor para correspondência. E-mail: nseangelista@ufrb.edu.br

ABSTRACT

Bivalve mollusks, present in polluted environments due to the release of solid waste and wastewater are considered risk foods because accumulate contaminants present in the environment in their tissues. The aim of this study was identify and search virulence genes in *Salmonella* strains isolated from water samples and bivalve mollusks. Nine *Salmonella* strains were used, five isolated from bivalve mollusks and four from estuarine water. The serotypes identification was through biochemical screening and serotyping. A survey of virulence genes *invA* (invasion), *pefA* (plasmid-encoded fimbriae) and *spvC* (virulence plasmid) was performed using the Polymerase Chain Reaction technique (PCR). *Salmonella* strains were identified as belonging to serovars, *S. Saintpaul* (1), *S. Typhimurium* (2), *S. Albany* (4) and *S. Montevideo* (2). The presence of the *invA* gene was identified in 44.4 % (4/9) of the isolates in three different serotypes, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium* and *S. Albany*. The *pefA* gene was detected in 22.2% (2/9) isolates, *S. typhimurium* and *S. Albany*, while *spvC* gene was not observed in any of the isolates. Among the serotypes identified, the presence of *S. Typhimurium* is worrying for being the second serotype involved in foodborne outbreaks, while the presence of *invA* and *pefA* genes increase the ability of bacterial virulence .

Keywords: serotyping, virulence, pathogenicity islands.

INTRODUÇÃO

O município de São Francisco do Conde situado na Baía de Todos os Santos e o município de Valença, localizado no Baixo Sul da Bahia são duas regiões que têm em comum a pesca artesanal, principalmente a mariscagem, atividade desenvolvida principalmente pelas mulheres e que contribui para o sustento familiar, bem como o atrativo turístico devido as suas belas paisagens e monumentos históricos.

No estado da Bahia tem-se um consumo significativo de frutos do mar, principalmente em pratos culinários do tipo moqueca (Cunha, 2010), além do consumo de ostras *in natura*. Por se tratar de organismos filtradores, os moluscos bivalves concentram e digerem algas, bactérias e partículas presentes na água. Concentram também contaminantes potencialmente nocivos, como toxinas e metais pesados, assim como agentes patogênicos bacterianos e virais, atuando como alimentos de alto risco para a saúde humana (Morrison et al., 2011).

Os ambientes aquáticos vêm sofrendo com a poluição em decorrência da ação antrópica, sendo o lançamento de águas residuais domésticas e industriais uma das principais atividades poluentes do ambiente aquático (Evangelista-Barreto et al., 2013). A poluição neste ambiente compromete a inocuidade dos moluscos bivalves, fazendo com que se tornem veiculadores de micro-organismos patogênicos para o homem (Duarte et al., 2010).

Dentre os micro-organismos de interesse na saúde pública e que se encontra envolvido em surtos alimentares envolvendo o consumo de moluscos bivalves tem-se a *Salmonella* (Farias et al., 2010). Esse gênero é composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella entérica*, compreendendo mais de 2.610 diferentes sorotipos (Guiboudenche et al., 2010). A identificação e nomenclatura das salmonelas são baseadas no esquema de Kauffman-White que tem como base a soroaglutinação dos antígenos O (somática), H (flagelar) e Vi (capsular) (Campos, 2005).

Devido à sua ampla distribuição na natureza e seu caráter patogênico, a salmonelose, doença causada pela *Salmonella*, representa uma importante doença tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Carrasco et

al., 2012). A via de transmissão da bactéria é a fecal-oral, por intermédio do contato direto ou indireto com animais infectados ou o consumo de água e alimentos contaminados (Nunes et al., 2010). Os sintomas incluem gastroenterite, náuseas e cefaléia, com período de incubação variando de seis a 72 horas (Budiati et al., 2013).

Estima-se que as infecções causadas por *Salmonella* ocorram em uma faixa de 200 a 1.300 milhões, com uma taxa de mortalidade em cerca de 3 milhões por ano (Aslam et al., 2012). A presença de *Salmonella* em alimentos de origem aquática (ostras, mexilhões e peixes) tem sido relatada por vários autores. Nascimento et al. (2011) analisaram sururu e ostras provenientes do mercado central da cidade de Aracaju-SE e observaram a presença da bactéria em todas as amostras.

A capacidade da *Salmonella* em causar doenças depende de vários fatores de virulência. Alguns desses fatores podem estar localizados em elementos genéticos móveis como *transposons* e plasmídeos, assim como nas Ilhas de Patogenicidade (IP), regiões específicas do cromossomo da bactéria responsáveis pela codificação de diversos fatores de virulência (Vieira, 2009 e Galdino et al., 2013).

Dentre os principais genes envolvidos na virulência de *Salmonella*, o gene *invA* localizado na SPI-1, é determinante na capacidade invasiva da bactéria nas células epiteliais. Este gene pode estar presente em todos os sorovares de *Salmonella*, permitindo que seja utilizado como alvo para a detecção da bactéria (Galdino et al., 2013). Outro gene de interesse é o gene *spvC*, localizado nos plasmídeos e responsável pela regulação da liberação de citocinas em células infectadas, enquanto o gene *pefA* codificado por um plasmídeo de virulência, media a adesão da *Salmonella* às células do epitélio intestinal (Oliveira et al., 2013).

Baseado nisso, o presente trabalho teve como objetivo identificar e pesquisar genes de virulência em isolados de *Salmonella* provenientes de amostras de água e moluscos bivalves em duas regiões do estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas nove cepas de *Salmonella* previamente isoladas a partir de amostras de água e de moluscos bivalves em dois estuários do estado da Bahia, São Francisco do Conde e Valença (Tabela 1). As cepas se encontravam armazenadas a 5° C na coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA, na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, Brasil.

Tabela 1. Origem e fonte dos isolados de *Salmonella*.

Origem	Número de isolados	Fontes
SFC	2	Ostra
	1	Sururu <i>in natura</i>
	1	Sururu processado
Valença	2	Água
	1	Ostra
	2	Água

SFC – São Francisco do Conde

Re-isolamento e sorotipagem de Salmonella

Para o reisolamento, as cepas foram inoculadas em caldo nutriente (Himedia®) e incubadas a 35° C/24 h. Após o crescimento em caldo, foram realizadas estrias em placas contendo agar Entérico Hektoen (Himedia®) e incubadas a 35° C/24 h. Colônias características foram retiradas e colocadas em agar estoque e em seguida submetidas aos testes de triagem bioquímica utilizando os meios agar Ferro Açúcar Triplo (TSI), agar Lisina Ferro (LIA), indol e teste de ureia (Rodrigues et al., 2006).

Para a caracterização dos sorovares os isolados foram enviados ao Laboratório de Enterobactérias no Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ – RJ, por meio da técnica de sorotipagem.

Extração de DNA cromossômico

As cepas de *Salmonella* foram inoculadas em caldo infusão cérebro e coração (Caldo BHI) (Acumedia®) e incubadas a 35° C/24 h. Após o crescimento em caldo BHI foram retiradas alíquotas de 1 mL e realizada a extração do DNA cromossômico utilizando kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®).

As amostras contendo o DNA amplificado foram analisadas em gel de agarose 1%. A corrida foi realizada em cuba horizontal de eletroforese (DIGEL; DGH12/DGH14®) a 80 V/500 mA, com duração de 50 minutos em solução tampão TBE 1 X. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio e os produtos amplificados foram visualizados no transluminador ultravioleta.

Pesquisa de genes de patogenicidade e virulência

Foram pesquisados por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) os genes de virulência *invA* (patogenicidade), *pefA* (virulência do plasmídeo codificado pela fímbria) e *spvC* (virulência plasmidial) (Tabela 2) .

Tabela 2. Iniciadores e condições da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados na investigação dos genes de virulência nos isolados de *Salmonella*.

Genes	Sequência dos iniciadores	pb	Ciclos	Condições de termociclagem
<i>pefA</i>	F: 5' gcgccgctcagccgaaccag 3'	157	1	94°C/3min.
	R: 5'gcagcagaagcccaggaaacagtg3'			94°C/1min.
<i>invA</i>	F: 5'acagtgctcgtttacgacctgaat 3'	244	30	58°C/1min.
	R: 5'agacgactggtactgatcgataat3'			72°C/1min.
<i>spvC</i>	F: 5'actcctgcacaaccaaatgcgga3'	571	1	72°C/5min.
	R: 5'tgtcttctgcatttcgccaccatca3'			

Fonte: Trafny et al. (2006)

Para a realização das reações de amplificação foi preparado um *mix* de reagentes (Tabela 3).

Tabela 3. Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação dos genes de virulência nas estirpes de *Salmonella*.

Reagentes da reação	PCR		
	Genes de virulência		
	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>invA</i>
Tampão 5 X	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL
Dntp's	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Iniciador F	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Iniciador R	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
MgCl ₂	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Taq polimerase	1 U	1 U	1 U
Vol. da reação	25 µL	25 µL	25 µL

Fonte: adaptado a partir de Galdino et al. (2013)

A presença do gene *invA* foi determinada utilizando a PCR simples e a técnica de multiplex-PCR foi empregada para os genes *spvC* e *pefA*. Um marcador de tamanho molecular de 100 pb (BioLabs®) foi usado como padrão para comparação do tamanho molecular dos genes. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio e os produtos amplificados foram visualizados no transluminador ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados

Na identificação das cepas de *Salmonella* foram identificados quatro sorotipos, *S. Typhimurium*, *S. Albany*, *S. Montevideo* e *S. Saintpaul* (Figura 1). *Salmonella* Albany foi o único sorotipo encontrado tanto no município de São Francisco do Conde quanto em Valença em ambos os substratos (água e

moluscos). *Salmonella* Typhimurium encontrada nos bivalves *in natura* e *S.* Saintpaul encontrada em água foi proveniente de São Francisco do Conde enquanto *S.* Montevideo encontrada na água de Valença.

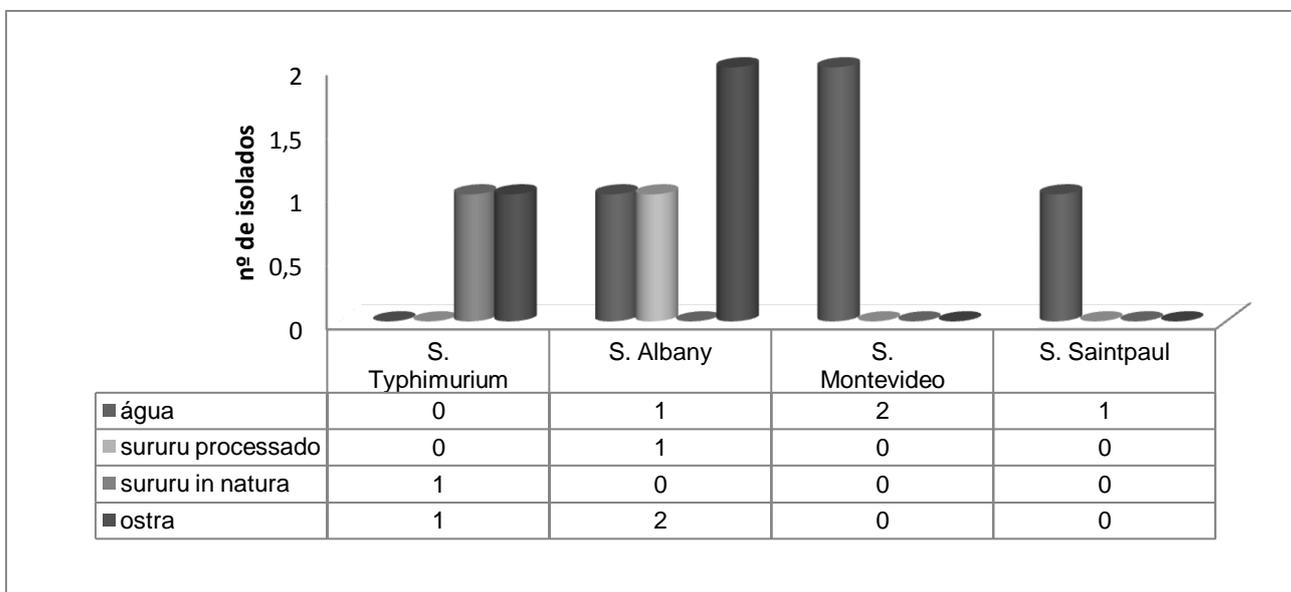


Figura 1. Perfil dos sorotipos de *Salmonella* isolados em amostras de água e moluscos bivalves nos municípios de São Francisco do Conde e Valença.

Os sorotipos de *Salmonella* podem estar adaptados a hospedeiros específicos, como *S.* Typhi, causadora da febre tifóide em humanos, ou ser ubíquitos, como *S.* Typhimurium, que causa infecções em humanos e animais (Campos, 2005 e Oliveira et al., 2013).

A presença de *S.* Typhimurium e *S.* Albany nas amostras de moluscos bivalves tanto *in natura* como processado mostram que esses alimentos representam um risco para a saúde da população, principalmente porque são ingeridos crus ou mal cozidos. A legislação brasileira preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do alimento (BRASIL, 2001).

A contaminação dos frutos do mar resulta da contaminação de origem fecal por meio da água poluída, manipuladores de alimentos infectados ou até mesmo a contaminação cruzada durante o processamento e comercialização desse alimento (Carrasco et al., 2012). Nos municípios estudados o processamento dos moluscos é realizado sem as Boas Práticas de Manipulação, uma vez que são

processados nas residências das marisqueiras, muitas vezes na porta de casa e na presença de insetos e animais.

Uma vez detectado a presença de *Salmonella* em amostras de moluscos bivalves, faz-se necessária a adoção de medidas preventivas para o controle de veiculação de agentes patogênicos nesses alimentos. Dentre as medidas preventivas se tem: a seleção de área de captura desses organismos, bem como a aplicação do processo de depuração dos moluscos bivalves após a sua captura (Evangelista-Barreto et al., 2008).

A presença de *S. Typhimurium* em moluscos bivalves é preocupante, uma vez que este sorotipo de *Salmonella* não-tifoide é o mais frequentemente isolado de alimentos causadores de surtos alimentares (Amagliani et al., 2012), sendo a sua prevalência em isolados de animais e humanos (Boxstael et al., 2012).

Em cepas de *Salmonella* isoladas de patos na Malásia, 29,6% dos isolados pertenciam ao sorotipo *S. Typhimurium* e 11,2% a *S. Albany* (Adzitey et al., 2012).

A presença de *S. Albany* nos isolados de água em ambos os municípios sugere que a contaminação ocorre pela presença de excretas de animais, uma vez que esse sorotipo é raramente isolado em processos infecciosos em humanos (Silva-Hidalgo et al., 2012). No entorno do estuário é frequente a criação de porcos e aves nos quintais das residências da comunidade. Este fato contribui para que os animais entrem em contato direto com o estuário, disseminando bactérias patogênicas de origem animal para os humanos.

A presença de *S. Albany* foi relatada em carcaças de frango em matadouros do Brasil (Silva-Hidalgo et al., 2012), enquanto Passos et al. (2011), relataram a presença de *S. Albany* em 16,6% de mexilhões em bancos naturais no estado de São Paulo.

Pinheiro et al. (2006), relataram *Salmonella* sp. e *S. Newport* em *sushi* e *sashimi* comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará. Segundo os autores este fato é preocupante, uma vez que mesmo em baixas concentrações de células a presença da bactéria é suficiente para causar a salmonelose. Silva et al. (2011) analisando amostras de água em uma área de extração de moluscos bivalves no estado da Bahia relataram a presença de *Salmonella* sp. em 43,4% (10/23) das amostras.

O sorotipo *S. Saintpaul* foi isolado apenas nas amostras de água no município de São Francisco do Conde, indicativo de que o estuário vem sofrendo com o lançamento de excretas humanas. Segundo Akiyama et al. (2011) *S. Saintpaul* é frequentemente isolada a partir de fontes humanas, tendo sido isolada em amostras de mariscos importados.

Devido ao curso da maré, os resíduos sólidos lançados no entorno do estuário acabam chegando aos locais de extração de moluscos bivalves e em virtude do sistema de filtração desses animais, carregam elevadas concentrações de micro-organismos. A presença de bactérias de origem fecal compromete a qualidade dos moluscos, importante produto da pesca que serve de subsistência para as populações costeiras.

Detecção dos genes de virulência

O mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* inclui diversos fatores de virulência. Entre eles os mais importantes são as adesinas, as invasinas e os fatores que inibem as defesas do hospedeiro (Vieira, 2009).

Na Tabela 4 são mostrados os resultados da pesquisa de genes de virulência das nove cepas de *Salmonella* isolados dos diferentes substratos.

Tabela 4. Presença dos genes de virulência nos diferentes sorotipos de *Salmonella* isolados em amostras de água e moluscos bivalves nos municípios de Valença e São Francisco do Conde, Bahia, Brasil.

Isolados	Origem	Sorovares	Genes de virulência		
			<i>pefA</i>	<i>invA</i>	<i>spvC</i>
1	Ostra	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	-
2	Ostra	<i>Salmonella</i> Albany	+	+	-
3	Sururu processado	<i>Salmonella</i> Albany	-	-	-
4	Ambiente	<i>Salmonella</i> Montevideo	-	+	-
5	Ambiente	<i>Salmonella</i> Montevideo	-	-	-
6	Ambiente	<i>Salmonella</i> Saintpaul	-	-	-
7	Ambiente	<i>Salmonella</i> Albany	-	+	-
8	Ostra	<i>Salmonella</i> Albany	-	-	-
9	Sururu <i>in natura</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-

+ presença do gene; - ausência do gene.

O gene *invA* foi detectado em quatro dos isolados, o gene *pefA* esteve presente em dois isolados, enquanto nenhum dos isolados foram capazes de expressar o gene *spvC* (Tabela 4).

Apenas 22,2% (2/9) dos isolados apresentaram dois dos genes de virulência, os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Albany*, sendo estes isolados nos moluscos (Tabela 4). Este fato demonstra a importância em não se consumir moluscos bivalves *in natura*, visto que a presença de genes relacionados à invasão celular (*invA*) e adesão (*pefA*) em uma mesma estirpe aumentam o seu grau de patogenicidade (Galdino et al., 2013).

Os fragmentos específicos para os genes *invA* foram amplificados para quatro amostras (44,4%) (Figura 2).

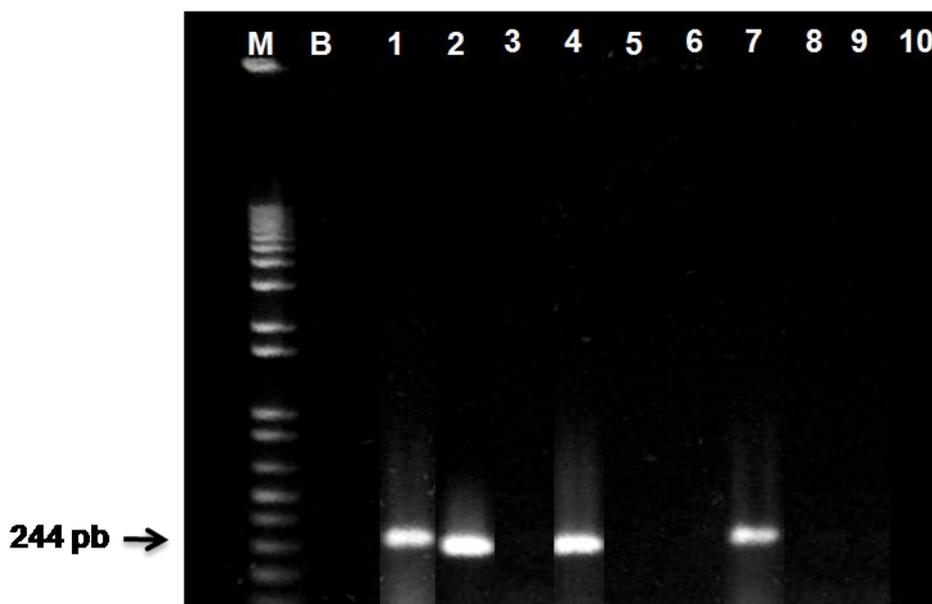


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *invA* em nove isolados de *Salmonella*; sendo M; marcador de peso molecular 100pb, B; Branco, linhas de 1 a 9 sorotipos de *Salmonella* e 10; controle negativo.

O gene *invA* é essencial para permitir a passagem da *Salmonella* através das células epiteliais, causando infecções sistêmicas devido à sua proliferação dentro do organismo do hospedeiro (Mohamed et al., 2014). Um percentual de 10% de isolados de *Salmonella* em ostras de cultivo nos Estados Unidos

apresentou a presença do gene *invA* (DePaola et al., 2010). Em um estudo desenvolvido no novo México com *Salmonella entérica* isoladas a partir de casos clínicos foi verificada a presença desse gene em todos os isolados (Smith et al., 2010).

Segundo Moussa et al. (2010), *S. Typhimurium* isolada a partir de carne de frango apresentou o gene *invA* em 100% dos isolados, enquanto Kumar et al. (2009), observaram esse gene em isolados provenientes de frutos do mar.

O gene *invA* é altamente conservado nas espécies e nos sorovares de *Salmonella*, sendo considerado alvo para sua detecção por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (Craciuna et al., 2012).

Salmonella Albany isolado de fezes de uma jaguatirica macho (*Leopardus pardalis*) no jardim zoológico do México também apresentou o gene *invA* (Silva-Hidalgo et al., 2012). No presente estudo este sorotipo também expressou o gene *invA*.

Salmonella Saintpaul foi o único sorotipo que não apresentou nenhum dos genes testados (Tabela 2). Dados semelhantes foram relatados por Akiyama et al. (2011) para o gene *pefA*.

O fragmento de amplificação para o gene *pefA* foi observado em 22,2% (2/9) dos isolados, enquanto nenhuma das estirpes apresentou o gene *spvC* (Figura 3).



Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *pefA* em nove isolados de *Salmonella*; sendo M; marcador de peso molecular 100pb e linhas de 1 a 9 sorotipos de *Salmonella*.

As fímbrias desempenham um papel importante na patogenicidade das bactérias. Em *Salmonella* promovem a sua fixação nas células epiteliais intestinais do hospedeiro (Bolton et al., 2013). A fímbria PEF é codificada pelo operon *pef* que é composto por quatro genes, dentre eles o gene *pefA* que se encontra presente em um plasmídeo de 90 Kb identificado em *S. Typhimurium* (Oliveira et al., 2013). Fato também observado no presente estudo, pois um dos isolados foi capaz de expressar o gene *pefA* em *S. Typhimurium* (Tabela 4).

Em estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas no Brasil a partir de diferentes fontes (alimento, humana e animal), apenas 2,7% (3/110) dois isolados não apresentaram o gene *pefA* (Castilla et al., 2006).

Salmonella Tuckey isolada durante o período de 2005 a 2008 na Tunísia em diferentes fontes, 87,7% dos isolados apresentaram o gene *invA* e nenhum gene *spvC* (Turki et al., 2012). Em *S. Enteritidis* isolada a partir de fontes humanas e animais no Iran apresentaram os genes *spvA*, *spvB* e *spvC* em 90% dos isolados de humanas e em 100% dos bovinos (Amini et al., 2010).

Bactérias do gênero *Salmonella* podem apresentar genes relacionados à invasão e virulência, mas nem sempre são capazes de expressá-los devido às condições de sobrevivência em que elas se encontram, como por exemplo, nível de oxigênio e pH (Campos, 2005 e Okamoto et al., 2010).

CONCLUSÃO

Foram identificados quatro sorotipos de *Salmonella*. Dentre os sorotipos identificados a presença de *S. Typhimurium* é preocupante por ser o segundo sorotipo mais envolvido em surtos alimentares, enquanto a presença dos genes *invA* e *pefA* aumentam a capacidade de virulência da bactéria.

REFERÊNCIAS

- Adzitey, F, Rusul, G, Huda, N (2012). Prevalence and antibiotic of *Salmonella* serovars in ducks, ducks rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Food Res. Int.* 45:947-952.
- Akiyama, T, Khan, AA, Cheng, CM, Stefanova, R (2011). Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples. *Food Microbiol.* 28:1124-1128.
- Amagliani, G, Brandi, G, Schiavano, GF (2012). Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Res. Int.* 45:780-788.
- Amini, K, Salehi, TZ, Nikbakht, G, Ranjbar, R, Amini, J, Ashrafganjooei, SB (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:2202-2210.
- BRASIL. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001.
- Aslam, M, Checkley, S, Avery, B, Chalmers, G, Bohaychuk, V, Gensler, G, Reid-Smith, R, Boerlin, P (2012). Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiol.* 32:110-117.
- Bolton, DJ, Ivory, C, McDowell, D (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 160:298-303.
- Boxstael, SV, Dierick, K, Huffel, XV, Uyttendaele, M, Berkvens, D, Herman, L, Bertrand, S, Wildemaue, C, Catry, B, Butaye, P, Imberechts, H (2012). Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Res. Int.* 45:913-918.
- Budiati, T, Rusul, G, Wan-Abdullah, WN, Arip, YM, Ahmad, R, Thong, KL (2013). Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. *Aquaculture.* 372-375:127-132.
- Campos, LC (2005). *Salmonella*. No L.Z Trabulsi e F. Alterthum (Eds.). Microbiologia, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.43. p.319-328.
- Carrasco, E, Morales-Rueda, A, García-Gimeno, RM (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Res. Int.* 45:545-556.
- Castilla, KS, Ferreira, CSA, Moreno, AM, Nunes, IA, Ferreira, AJP (2006). Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37:135-139.
- Cunha, MA. Composição química e nutricional de preparações de origem africana, típicas da culinária baina. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia.

- Craciuna, C, Keu, AL, Flonta, M, Cristea, M (2012). DNA-base diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. J. Environ. Manag. 95:15-18.
- DePaola, A, Jones, JL, Woods, J, Burkhardt III, W, Calci, KR, Krantz, JA, Bowers, JC, Kasturi, K, Byars, RH, Jacobs, E, Williams-Hill, D, Nabe, K (2010). Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey. Appl. Environ. Microbiol. 76:2754-2768.
- Duarte, DAM, Ribeiro, AR, Vasconcelos, AMM, Silva, JVD, Andrade, PLA, Santana, AAP (2010). Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em pescado no Nordeste, Brasil. Arq. Inst. Biol. 77(4):711-713.
- Evangelista-Barreto, NS, Sousa, OV, Vieira, RHSF (2008). Moluscos bivalves: Organismos bioindicadores da qualidade microbiológica das águas: uma revisão. RBHSA. 2 (2):17-29.
- Evangelista-Barreto, NS, Silveira, CS, Paim, IS, Saraiva, MAF (2013). Avaliação do impacto ambiental no rio Subaé, São Francisco do Conde-BA, através de bioindicadores de contaminação fecal. Magistra. 25(2): 164-169.
- Farias, MF, Rocha-Barreira, CA, Carvalho, FCT, Silva, CM, Reis, EMF, Vieira, RHSF (2010). Condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Mollusca: Bivalva: Solecurtidae) e da água no estuário do Rio Ceará, em Fortaleza – CE. Bol. Inst. Pesca. 36(2):135-142.
- Galdino, VMCA, Melo, RT, Oliveira, RP, Mendonça, EP, Nalevaiko, PC, Rossi, DA (2013). Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. Biosci. J. 29(4):932-939.
- Guibourdench, M, Roggentin, P, Mikoleit, M, Fields, PI, Bockemuhl, J, Grimont, PAD, Weill, FX (2010). Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffman-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 161:26-29.
- Kumar, R, Surendram, PK, Thampuran, N (2009). Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. Food Control, 20:376-380.
- Mohamed, T, Zhao, S, White, DG, Parveen, S (2014). Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky isolated from pre-and post-chill whole broilers carcasses. Food Microbiol. 38:6-15.
- Morrison, CM, Armstrong, AE, Evans, S, Mild, RM, Langdon, CJ, Joens, LA (2011). Survival of *Salmonella* Newport in oysters. Int. J. Food Microbiol. 148:93-98.
- Moussa, IM, Gasseem, MA, Al-Doss, AA, Mahmoud, WA, Sadik, Abdel Mawgood, AL (2010). Using molecular techniques for rapid detection of *Salmonella* serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh, Saudi Arabia. Afr. J. Biotechnol. 9(5):612-619.
- Nascimento, VA, Mittaraquis, ASP, Travália, BM, Santos, RCA, Nunes, ML, Aquino, LCL (2011). Qualidade microbiológica de moluscos bivalves – Sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. Scientia Plena, 7(4):1-5.
- Nunes, OC, Oliveira, ED, Laborda, SS, Hohlenwerger, JC, Moraes Neto, M, Franke, CR (2010). Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. de Jabutis-

- piranga (*Chelonoidis carbonaria*) oriundos do tráfico de animais silvestres. Ci. Anim. Bras. 11(1):168-173.
- Okamoto, AS, Andreatti Filho, RL, Rocha, TS, Menconi, A, Marietto-Gonçalves, GA (2009). Relation between the *spvC* and *invA* virulence genes and resistance of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis from avian material. Int. J. Poul. Sci. 8(6):579-582.
- Oliveira, AP, Sola, MC, Feistel, JC, Moreira, NM, Oliveira, JJ (2013). *Salmonella* Enterica: Genes de virulência e Ilhas de patogenicidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 9(16):1947-1972.
- Passos, EC, Mello, ARP, Sousa, CV, Oliveira, MA, Casarini, LM, Motta, NS, Henriques, MB, Machado, IC, De Rosso, VV, Rivera, ING (2011). Detecção de *Salmonella* spp. em mexilhões *Perna perna* dos bancos naturais de uma baía densamente urbanizada. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 70:631-636.
- Pinheiro, HMC, Vieira, RHSF, Carvalho, FCT, Reis, EMF, Sousa, OV, Vieira, GHF, Rodrigues, DP (2006). *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes em *sushi* e *sashimi* comercializados na cidade de Fortaleza – Ceará. Bol. Téc. Cient. CEPENE, 14(1):23-31.
- Rodrigues, DP, Lázaro, NS, Reis, EMF (2006). Manual de Procedimentos para Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella*. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCrúz, p.50.
- Silva, IP, Pereira, AF, Silveira, CS, Evangelista-Barreto, NS (2011). Presença de *Salmonella* spp em um ambiente natural de extração de ostras. Hig. Aliment. 25:742-743.
- Silva-Hidalgo, GS, López-Moreno, HS, Ortiz-Navarrete, VF, Juárez-Barranco, F, López-Valenzuela, M (2012). Excreción fecal de *Salmonella* Albany, su aislamiento en la ración alimenticia y repercusión en el estado de salud de un ocelote (*Leopardus pardalis*) en cautiverio. Vet. Méx. 43(1):59-69.
- Smith, KP, George, J, Cadle, KM, Kumar, S, Aragon, SJ, Hernandez, RL, Jones, SE, Floyd, JL, Varela, MF (2010). Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and genotyping of *Salmonella enterica* isolates from clinical cases of salmonellosis in New Mexico in 2008. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:1025-1031.
- Trafny, EA, Kozłowska, K, Szpakowska, M (2006). A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enteric* serovar Enteritidis in human faeces. Lett. Appl. Microbiol. 43:673-679.
- Turki, Y, Ouzari, H, Mehri, I, Aissa, RB, Hassen, A (2012). Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. Food Res. Int. 45:940-946.
- Vieira, MAM (2009). *Ilhas de patogenicidade*. O Mundo da Saúde, São Paulo, 33, 406-414.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O lançamento de esgotos domésticos, indústrias e a criação de animais próximos aos estuários, assim como o crescimento demográfico desordenado nas cidades litorâneas vem impactando o ambiente aquático, fato decorrente principalmente da falta de saneamento básico em várias cidades do estado da Bahia. A contaminação destes ambientes é preocupante, uma vez que a pesca artesanal e a mariscagem são atividades de subsistência em várias comunidades ribeirinhas.

Nas regiões litorâneas do estado da Bahia, como nos municípios de Valença e São Francisco do Conde, o consumo de frutos do mar, como ostras e sururu, faz parte da culinária local, tanto pela comunidade, como pelos turistas que visitam a região. Assim, faz-se necessário o monitoramento nas áreas de extração de moluscos bivalves, bem como a aplicação de tratamentos secundários, como o processo de depuração dos organismos a fim de garantir a inocuidade do alimento.

O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária e o descarte inadequado destes fármacos no ambiente aquático vêm fazendo com que aumente cada vez mais o surgimento de estirpes resistentes, fato preocupante, pois essa característica adquirida pela bactéria dificulta o tratamento das infecções. Apesar de haver um maior controle na venda de antimicrobianos, a automedicação ainda é uma realidade, bem como a indicação rotineira de antimicrobianos de amplo espectro pelos profissionais da área de saúde.