

**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**

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES E
ÁGUA EM DOIS ESTUÁRIOS DA REGIÃO DO BAIXO SUL, BAHIA**

NOELY MARQUES FERREIRA GRISE

**CRUZ DAS ALMAS-BA
SETEMBRO – 2016**

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA EM DOIS ESTUÁRIOS DA REGIÃO DO BAIXO SUL, BAHIA

NOELY MARQUES FERREIRA GRISE

Médica Veterinária

Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2013.

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: Prof^a Dr^a Norma Suely Evangelista-
Barreto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Amélia Alves
Duarte

CRUZ DAS ALMAS-BA

SETEMBRO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Grise, Noely Marques Ferreira.

Identificação e perfil de resistência antimicrobiana de enterobactérias isoladas de moluscos bivalves e água em dois estuários da região do Baixo Sul, Bahia / Noely Marques Ferreira Grise. - Cruz das Almas: 2016. 72 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

Orientador (a): Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto.

Co-orientador (a): Dr^a. Elizabeth Amélia Alves Duarte.

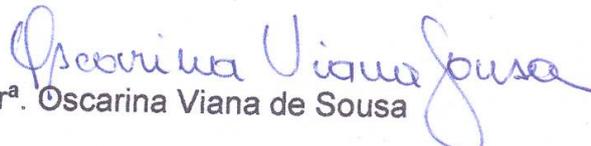
1. Suscetibilidade antimicrobiana.
2. Ostras.
3. Escherichia coli.
4. Saúde pública. I. Título.

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

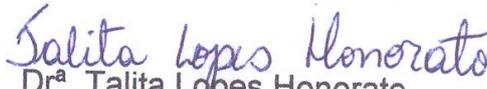
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
NOELY MARQUES FERREIRA GRISE


Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Orientadora)


Dr^a. Oscarina Viana de Sousa

Universidade Federal do Ceará (examinador 1)


Dr^a. Talita Lopes Honorato

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (examinador 2)

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

*Ao meu Deus e minha família que sempre
me deram força pra seguir e nunca desistir!*

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa caminhada muitas lutas e escolhas foram traçadas, algumas dificuldades, mas também várias foram as conquistas. É com muito amor e satisfação que agradeço e dedico essa vitória a todos que contribuíram para a concretização desse sonho.

A **Deus** todo o meu amor e gratidão por sempre me dar forças pra seguirem frente e não desistir diante dos obstáculos durante essa jornada. A nossa **Senhora das Graças** pela intercessão, carinho e proteção.

Aos meus pais **Luedilson Pires Ferreira** e **Natalícia Marques de Araújo** pelo cuidado, esforço, credibilidade e apoio incondicional para que eu pudesse sempre buscar os meus sonhos, minha eterna gratidão “sem vocês eu não estaria aqui”. Aos meus **irmãos**, em especial **Lívia** e **Nívia Maria** pela dedicação e amizade de sempre. Vocês são acima de tudo presentes de Deus. Aos meus sobrinhos **Felipe** e **Maria Cecília** pelos momentos de alegria e esperança.

Ao meu esposo **Thiago Grise** pela paciência e companheirismo, a você minha gratidão e o meu amor. Ao meu pequeno Príncipe **Bernardo**, que mesmo tão pequenino já enche meu coração de amor... “Mamãe está ansiosa pra vê o seu rostinho filho”!

A minha Orientadora Prof^a. **Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto**, um exemplo de determinação e profissionalismo, que acreditou que eu era capaz e sempre me incentivou. O seu “sim” foi fundamental para a realização desse sonho.

A minha co-orientadora **Dr^a. Elizabeth Amélia Alves Duarte** e **Dr. Thiago Oliveira** pela oportunidade, disponibilidade e contribuição na realização desse trabalho. A toda equipe do laboratório de Biologia Molecular da UFRB.

Aos colegas e amigos que conquistei no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho, em especial **Elaine, Iara, Jéssica, Antônia** (minha Bá), **Virgínia, Brenda, Paulo, Aline, Jailza, Adriana e Irana**.

A minha amiga **Vaneza** que sempre esteve ao meu lado, obrigada pelo companheirismo e amizade, que Deus te abençoe e Nossa Senhora te cubra com seu manto materno. Ah, muito obrigada pelas aventuras durante a caminhada,

especialmente nas coletas e nas marmitas de almoço que dividimos muitas vezes, sem você isso não seria possível.

Aos amigos de turma do curso de mestrado em especial **Leandro, Josélia, Valdenia, Grazi, Marcelly, Gabrielly, Lívia, Monique, Marcos, Elina...** Obrigada pela amizade e parceria de sempre.

Ao senhor **Jailton** (pescador), pela contribuição no trabalho e disponibilidade em nos acompanhar durante as coletas e ao motorista da UFRB Sr. **Jorge**, que sempre com alegria e cuidado nos conduzia durante a realização do trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho e sempre acreditaram.

Agradeço também ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB pela concessão da bolsa e a CAPES em seu Programa PNPd.

A minha banca examinadora Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana Sousa e a Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato pelas contribuições no trabalho.

A minha eterna gratidão!

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média do Número Mais Provável (log NMP/100 mL ou g) de coliformes a 35°C e a 45°C, presença de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. das amostras de água e ostras no estuário do rio Una, Torrinhás, Baixo Sul, Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.	61
Tabela 2. Número Mais Provável (log NMP/100 mL) de coliformes a 35°C e a 45°C presença de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. das amostras de ostras no estuário do rio Una, Torrinhás, Baixo Sul, Bahia, e de Taperoá durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.	61
Tabela 3. Categorias para retirada de moluscos bivalves de acordo com o Programa Nacional de Controle Higiênicossanitário de Moluscos Bivalves (Brasil, 2012).	61
Tabela 4. Percentual de resistência de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de água e ostras nos estuários de Torrinhás e Taperoá, Baixo Sul da Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.	62
Tabela 5. Perfil de multirresistência e resistência plasmidial das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de água e moluscos bivalves em dois estuários do Baixo Sul, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.	62
Tabela 6. Produção fenotípica de β -lactamases e detecção de genes de resistência em cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de água e moluscos bivalves em dois estuários do Baixo Sul, Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de localização dos pontos de coleta nos estuários de Taperoá e Torrinhas.	59
Figura 2. Cultivo de ostra localizado no município de Cairú, localidade Torrinhas.	60
Figura 3. Banco natural de ostra localizado no município de Taperoá.	60

INDÍCE

	Página
Resumo	
Abstract	
Introdução	16
CAPÍTULO 1	
Moluscos bivalves como veículos na disseminação de enterobactérias resistentes	19
Resumo	20
1. Atividade pesqueira	22
2. Moluscos bivalves	23
3. Doenças veiculadas por alimentos	24
4. Grupo coliforme	25
5. O gênero <i>Escherichia</i>	26
6. O gênero <i>Salmonella</i>	28
7. Resistência Antimicrobiana	29
7.1. Antimicrobianos β -lactâmicos	31
8. Referências	34
CAPÍTULO 2	
Identificação e perfil de resistência Antimicrobiana de enterobactérias isoladas de moluscos bivalves e água	42
Resumo	43
Introdução	44
Materiais e métodos	45
Descrição da área e coleta das amostras	45
Análises microbiológicas	47
Suscetibilidade Antimicrobiana	47
1. Múltipla resistência antimicrobiana	47
Cura do plasmídeo	48

Produção de β -lactamases	48
Caracterização molecular de <i>Escherichia coli</i> e detecção de genes codificadores de β -lactamases	48
Análise estatística	49
Resultados e discussão	49
Análise microbiológica da água e moluscos bivalves	49
Perfil de suscetibilidade Antimicrobiana	51
Detecção de produção de β -lactamases	53
Conclusão	54
Agradecimentos	55
Referências	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
ANEXOS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
Aw	Atividade de água
ATM	Aztreonam
Ba	Bahia
BVA	Agar Verde Brilhante
CAZ	Ceftazidima
CBVB	Caldo Bile Verde Brilhante
CDC	Centro Norte-Americano para Controle e Prevenção de Doenças
CIP	Ciproflaxacina
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CLO	Cloranfenicol
CLS	Caldo Lauril Sulfato Triptose
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRO	Ceftriaxona
DVA	Doenças veiculadas por alimentos
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
EST	Estreptomicina
ESBL	β -lactamase de Espectro Estendido
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EMB	Eosina Azul de Metileno
g	Gramma
GEN	Gentamicina
HE	Hektoen
IMP	Imipinem
LB	Luria Bertani

LT	Termolábil
LABMAA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental
log	Logaritmo
MAR	Múltipla resistência antimicrobiana
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NAL	Ácido Nalidixíco
NMP	Número Mais Provável
PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênicosanitário de Moluscos Bivalves
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
ST	Termoestável
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SUT	Sulfazotrim
TET	Tetraciclina
TSA	Triptona Soja Agar
UFC	Unidade formadora de colônia
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA EM DOIS ESTUÁRIOS DA REGIÃO DO BAIXO SUL, BAHIA

Dentre as espécies de bactérias capazes de causar infecções em humanos se destacam as estirpes *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. A capacidade desses microrganismos em promover gastroenterite humana associada ao consumo de moluscos in natura ou levemente cozidos, tem aumentado a sua importância em surtos alimentares se tornando um alerta para a saúde pública. Baseando nisso, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em dois estuários da região do Baixo Sul, Bahia, bem como verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados. Para isso, foram realizadas seis coletas de ostras e água em uma área de cultivo e ostras extraídas de bancos naturais. Para a suscetibilidade antimicrobiana foram utilizados 15 fármacos de seis famílias. A produção de enzimas β -lactamases (β Ls) foi verificada por meio de testes fenotípicos e genotípicos (*bla*TEM-1, *bla*CTX-M e *bla*SHV). Na área de cultivo, as amostras de água apresentaram densidade microbiana de coliformes a 35°C de 2,85 log NMP/100 mL e a 45°C de 2,50 NMP/100 mL, enquanto nas amostras de ostras os valores foram de 2,65 log NMP/100 g para coliformes a 35°C e de 2,30 log NMP/100 g para coliformes a 45°C. Para as ostras do extrativismo a densidade de coliformes a 35°C foi de 3,30 log NMP/100 g e a 45°C de 3,15 log NMP/100 g. *Escherichia coli* foi isolada em 50% das amostras de água e 67% das amostras de ostras de extrativismo, com ausência nas ostras de cultivo. Não foi observada a presença de *Salmonella* em qualquer das amostras. As cepas de *Escherichia coli* provenientes da água de cultivo do estuário de Torrinhas apresentaram apenas perfil intermediário de resistência antimicrobiana (57,14%). As cepas isoladas das ostras de extrativismo apresentaram resistência antimicrobiana de 60% e 20% para resistência intermediária, com maior resistência verificada aos β -lactâmicos (71,42%). Perfil de multiresistência (40%) foi observado apenas para *Escherichia coli* isoladas das ostras de extrativismo, com índice de múltipla resistência (MAR) variando de 0,13 a 0,20. Quanto a origem genética da resistência, esta foi

equivalente entre plasmidial (50%) e cromossômica (50%), sendo que as cepas isoladas da água apresentaram maior percentual de resistência plasmidial (62,50%). Fenotipicamente não foi observada a produção de enzimas β -lactamases. A presença dos genes *bla*TEM-1 e *bla*CTX-M foi observada em 83,33% e 8,33% das cepas de *Escherichia coli*, respectivamente. Não foi observada a presença do gene *bla*SHV. A presença de *Escherichia coli* contendo genes de resistência nos estuários de Taperoá e Torrinhas, Bahia, mostra que os moluscos bivalves extraídos ou coletados na região devem passar por um processo de depuração antes de submetidos a comercialização visando minimizar a presença de estirpes bacterianas contendo genes de resistência antimicrobiana. A presença de isolados de *Escherichia coli* com genes de resistência do tipo *bla*TEM-1 e *bla*CTX-M chama a atenção quanto a propagação destas bactérias para o ambiente estuarino.

Palavras-chaves: suscetibilidade antimicrobiana, ostras, *Escherichia coli*, saúde pública.

ABSTRACT

FERREIRA-GRISE. N. M. IDENTIFICATION AND PROFILE OF ANTIMICROBIAL ENTEROBACTERIA ISOLATED BIVALVE MOLLUSCS STRENGTH AND WATER IN TWO ESTUARIES IN SOUTH LOW REGION, BAHIA

Among those species of bacteria capable of causing infections in humans stand strains *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The ability of these microorganisms in causing human gastroenteritis associated with consumption of shellfish raw or lightly cooked, has increased its importance in food outbreaks becoming an alert to public health. Based on this, this study aimed to evaluate the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Two estuaries (cultivation of oysters and extraction) Southern Lowlands, Bahia and check the profile of antimicrobial susceptibility of isolates. For this, there were six collections of oysters and water in an area of cultivation and extracted natural oyster banks. For antimicrobial susceptibility were employed 15 drug six families. The production of β -lactamase enzymes (β Ls) was verified by phenotypic and genotypic tests (*bla*TEM-1, *bla*CTX-M and *bla*SHV). In the cultivation area the water samples had microbial density coliforms at 35°C (2.85 log MPN / 100ml) and 45°C (2.50 MPN / 100 ml) higher than the oyster samples (35°C - 2.65 log MPN / 100g 45°C - 2.30 log MPN / 100g). For the extraction of oysters density of coliforms at 35°C was 3.30 log MPN / 100 g at 45°C of 3.15 log MPN / 100 g. *Escherichia coli* was isolated in 50% of water samples and 67% of the samples for extraction of oysters. It was observed the presence of *Salmonella* in any of the samples. Strains of *Escherichia coli* from Torrinhas estuary growing water showed only antimicrobial resistance intermediate profile (57.14%). Isolates of extraction of oysters showed antimicrobial resistance of 60% and 20% intermediate resistance with greater resistance checked to β -lactam (71.42%). Multiresistant profile (40%) was only observed for *Escherichia coli* isolated from the extraction of oysters, with multiple resistance index (MAR) ranging from 0.13 to 0.20. Regarding the type of antimicrobial resistance, 50% showed resistance mediated by plasmids and 50% Chromosome, and the strains of the water showed a higher percentage of plasmid resistance (62.50%). Phenotypically was not observed the production of β -lactamase enzymes. The presence of *bla*TEM-1 and *bla*CTX-M genes was observed at 83.33% and 8.33% of the strains of *Escherichia coli*, respectively. It was observed the

presence of the gene *bla*SHV. The presence of *Escherichia coli* containing resistance genes in the estuaries of Taperoá and Torrinhas, Bahia, shows that the extracted bivalves or collected in the region must go through a purification process before undergoing marketing to minimize the presence of bacterial strains shellfish containing genes antimicrobial resistance. The presence of isolates of *Escherichia coli* with resistance genes *bla*TEM-1 and *bla*CTX-M type, draws attention as the spread of these bacteria to the estuarine environment.

Keywords: antimicrobial susceptibility, oysters, *Escherichia coli*, public health.

INTRODUÇÃO

O estuário é uma área ao longo da costa marítima, onde ocorre a fusão do rio com o mar. A mistura da água doce e salgada torna os estuários ambientes com características físicas e químicas únicas, capazes de albergar inúmeras espécies aquáticas. Além disso, esses ambientes são fortemente influenciados pelas marés, o que caracteriza o estuário um ambiente de água salobra. Atualmente são ambientes ameaçados pela influência antrópica, como o lançamento de esgotos doméstico e industrial nos corpos aquáticos que acabam degradando o ambiente (SANDE et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011).

As águas contaminadas por dejetos domésticos ou industriais influenciam de forma direta a qualidade dos recursos pesqueiros e organismos utilizados na alimentação, podendo ocasionar surtos alimentares. A microbiota presente na carne dos moluscos bivalves retrata a qualidade do ambiente em que estes estão sendo cultivados ou extraídos (OLIVEIRA et al., 2010).

Os moluscos bivalves são alimentos consumidos principalmente em regiões costeiras e que se destacam pelo seu elevado valor nutricional, fonte de proteína e minerais. Esses organismos têm chamado a atenção mundial, não só pelo aumento de sua produção e consumo, mas pelo fato de atuarem como indicadores biológicos de poluição fecal nos locais onde são cultivados, devido seu processo de alimentação por filtração (SANDE et al., 2010). Durante esse processo os moluscos bivalves acumulam não apenas o fitoplâncton que compõe seu principal alimento, como também metais pesados, pesticidas, biotoxinas e microrganismos enteropatogênicos como *Salmonella* e *Escherichia coli*, amplamente citados em surtos alimentares (RODRIGUES et al., 2009).

O risco alimentar associado ao consumo de moluscos bivalves se deve ao hábito cultural de algumas regiões em consumirem esses organismos crus ou levemente cozidos (NASCIMENTO et al., 2011). Diversas espécies bacterianas ambientais são reconhecidas como patógenos de interesse para a saúde pública, uma vez que podem ocasionar doenças como gastroenterites, hepatite, meningite, dentre outras enfermidades (OLIVEIRA et al., 2010).

As bactérias provenientes de contaminação de origem fecal, como os gêneros *Salmonella* e *Escherichia* estão entre os principais microrganismos veiculados pelos moluscos bivalves. O gênero *Salmonella* tem sido responsável por grandes surtos de gastroenterite de ocorrência mundial, enquanto a espécie *Escherichia coli* é reconhecida

como um indicador de outros patógenos, de natureza bacteriana, viral ou parasitária, além de apresentar estirpes patogênicas como O157:H7 (MORRISON et al., 2011).

Outro problema ambiental envolvendo o consumo de alimentos marinhos diz respeito ao descarte de resíduos, como antimicrobianos, que chegam aos corpos d'água por meio de fezes ou urina devido a falta de saneamento básico ou tratamento adequado da rede de esgoto dos municípios costeiros. Os dejetos ao atingirem o ambiente aquático, como os estuários, contribuem para a alteração da microbiota indígena promovendo a propagação de genes de resistência entre as bactérias (MANJUSHA; SARITA, 2013).

Dentre os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana estão os β -lactâmicos, cuja resistência está relacionada a produção de enzimas capazes de hidrolisarem o anel β -lactâmico, dentre estas enzimas, estão as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) as quais normalmente possuem atividade contra bactérias Gram-negativas (PONTES et al., 2009), hidrolisando penicilinas e cefalosporinas de terceira geração (BUSH, 2010). Com isso, tem sido cada vez mais frequente o relato de bactérias resistentes a determinados agentes bactericidas, gerando um problema para a medicina devido o tratamento ineficaz de infecções (MANJUSHA; SARITA, 2013; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014; IREDELL, BROWN, TAGG, 2016).

Elevada resistência a antimicrobianos normalmente utilizados em tratamentos clínicos como o ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim e ciprofloxacina foi relatado em cepas de *Salmonella* isoladas de peixe, camarão, lagosta e caranguejo (RAHIMI et al., 2013), enquanto Vieira et al. (2010) alertaram sobre a presença de cepas de *Escherichia coli* isoladas de camarão e ostras resistentes aos antimicrobianos tetraciclina e imipenem.

Assim, o monitoramento de áreas de cultivo ou em bancos naturais de extração deve ser contínuo, principalmente quando se trata de moluscos bivalves, uma vez que estes podem servir de veículo na disseminação de enterobactérias multirresistentes quando ingeridos sem tratamento térmico.

OBJETIVOS

Geral

Monitorar a presença de enterobactérias em ostras de cultivo e de extrativismo, bem como traçar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas isoladas.

Objetivos Específicos

1. Quantificar o grupo coliforme a 35°C e a 45°C em amostras de água e ostras;
2. Isolar e identificar estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.;
3. Verificar os perfis de resistência das estirpes isoladas;
4. Caracterizar a origem da resistência antimicrobiana como intrínseca ou adquirida;
5. Detectar a presença de cepas produtoras de enzimas β -lactamases (β Ls);
6. Verificar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos.

CAPÍTULO 1

Moluscos bivalves como veículo na disseminação de enterobactérias resistentes

RESUMO

FERREIRA-GRISE. N. M. Moluscos bivalves como veículo na disseminação de enterobactérias resistentes

Este capítulo tem como objetivo apresentar uma revisão sobre o conhecimento do potencial dos moluscos bivalves como veículo na disseminação de doenças e enterobactérias resistentes aos antimicrobianos. Os moluscos bivalves possuem hábito alimentar filtrador e bioacumulador, se alimentando de partículas em suspensão na água, o qual provém de um fluxo de água. A falta de seletividade das ostras durante o processo de alimentação que é por filtração faz com que a microbiota presente nos moluscos bivalves seja dependente da qualidade da água no qual é capturado e/ou cultivado, bem como da qualidade da água utilizada nas etapas de lavagem e processamento, além da estocagem e manipulação. Dessa forma os moluscos abrigam inúmeros patógenos humanos, como enterobactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* e algumas estirpes de *Escherichia coli*. Essas bactérias podem atingir o ambiente aquático por meio de lançamentos de esgotos domésticos ou industriais sem tratamento adequado, contribuindo para a contaminação das águas e conseqüentemente dos moluscos pelo processo de bioacumulação, o que pode resultar no aparecimento de doenças veiculadas por alimentos. Esses microrganismos são de grande relevância para a saúde pública por se envolverem em surtos alimentares. Muitos dos surtos estão relacionados com cepas patogênicas de *Escherichia coli* ou uma variedade de fatores de virulência encontrados em *Salmonella* spp.. Aliado a isso, tem-se o aumento da resistência de microrganismos aos antimicrobianos devido ao uso abusivo ou prolongado desses fármacos, bem como seu descarte em reservatórios hídricos. A presença de bactérias potencialmente patogênicas e resistentes a múltiplos fármacos em alimentos oriundos de ambientes aquáticos, como os moluscos bivalves, representa um risco para as comunidades costeiras, que utilizam o ambiente para obtenção de alimento, sustento da família ou lazer.

Palavras chave: moluscos bivalves, bioacumulação, microrganismos resistentes.

ABSTRACT

FERREIRA-GRISE. N. M. Bivalve molluscs as vehicles in the spread of resistant Enterobacteriaceae

This chapter aims to present a review of the knowledge of the potential of bivalve molluscs as a vehicle in the spread of resistant disease and enterobacteria to antimicrobials. Bivalve molluscs have food slicer and bioaccumulative habit, feeding on particles suspended in water, which comes from a stream of water. The lack of selectivity of oysters during the feeding process which is filtered off causes the microbes present in the bivalve mollusks is dependent on the water quality which is captured and / or cultivated, and the quality of the water used in the washing steps and processing, as well as storage and handling. Thus mollusks house numerous human pathogens such as enterobacteria belonging to the genus *Salmonella* and certain strains of *Escherichia coli*. These bacteria can reach the aquatic environment through domestic sewage or industrial releases without proper treatment, contributing to water contamination and consequently the mollusc the process of bioaccumulation, which can result in the appearance of foodborne illnesses. These microorganisms are of great relevance to public health by engaging in food outbreaks. Many of the outbreaks are related to pathogenic strains of *Escherichia coli* or a variety of virulence factors found in *Salmonella* spp.. In addition to that, there is the increasing resistance of microorganisms to antibiotics due to abuse or prolonged use of these drugs, as well as their disposal in water reservoirs. The presence of potentially pathogenic bacteria and resistant to multiple drugs in food from aquatic environments, such as bivalve molluscs, is a risk for coastal communities, using the environment to obtain food, family livelihood or leisure.

Keywords: bivalve molluscs, bioaccumulation, resistant microorganisms.

1. A ATIVIDADE PESQUEIRA

O consumo de pescado promove inúmeros benefícios a saúde, entre eles a fácil digestão, prevenção de doenças cardiovasculares, alto teor de ômega 3, além de auxiliar no desenvolvimento cerebral. Em decorrência desse conhecimento tem-se aumentado o consumo de peixes e outros organismos aquáticos (BAHIA PESCA, 2012).

A produção mundial de pescado até 2014 foi de 158 milhões de toneladas, com a China se destacando como o maior produtor, com uma produção de 48 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Na América do Sul, o Brasil até 2012 ocupava o segundo lugar na produção de moluscos com 210.000 t, superado apenas pelo Chile com 631.600 t. Essa atividade vem sendo cada vez mais empregada por pescadores e marisqueiras como uma alternativa de renda e alimento, uma vez que esse trabalho possui grande identificação entre eles, permitindo sua permanência em seu local de origem (BAHIA PESCA, 2012).

A produção nacional de moluscos se encontra distribuída nos Estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Espírito Santo, Sergipe e Bahia, sendo Santa Catarina o maior produtor nacional de ostras, mexilhões e vieiras, com uma produção de 21,65 mil toneladas, o que correspondeu a 98% da produção nacional em 2014 (IBGE, 2015).

A costa da Bahia é a mais extensa do Brasil com 1.118 km, nessa área residem aproximadamente 30% da população do Estado (IBGE, 2010). O litoral baiano possui cerca de 350 comunidades pesqueiras, destacando-se a região do Baixo Sul com um grande número de estuários, originando uma ampla rede de manguezais de grande potencial para o sustento das populações de pescadores e marisqueiras que vivem nessas comunidades (BAHIA PESCA, 2012).

Os estuários são ambientes ameaçados pela influência antrópica, assim como o lançamento de esgotos doméstico e industrial nos corpos aquáticos que acabam degradando o ambiente (SANDE et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011).

A utilização de recursos pesqueiros, como a extração de ostras de bancos naturais tem ocasionado a degradação dos ecossistemas locais, devido a captura descontrolada de organismos aquáticos de interesse comercial, para geração de alimento e renda por comunidades ribeirinhas. Conseqüentemente, a extração de ostras ocorre sem controle ou planejamento, vendidas em tamanho comercial ou ainda como sementes para a utilização em cultivos (SANDE et al., 2010; BAHIA PESCA, 2012).

A criação de ostras é uma alternativa de geração de renda com sustentabilidade e respeito ao meio ambiente. Além disso, o cultivo permite que o estoque dos manguezais volte a crescer, diminuindo o esforço de colheita das ostras em vida livre (BAHIA PESCA, 2012).

2. MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos bivalves possuem hábito alimentar filtrador e bioacumulador, deste modo se alimentam de partículas em suspensão na água. As valvas são mantidas ligeiramente abertas para a entrada do alimento, que é levado pelos palpos labiais até a boca, a qual se encontra ligada ao estômago por um curto esôfago. A partir do estômago, o alimento segue para os divertículos digestivos e intestino. No início deste encontra-se uma pequena estrutura de consistência gelatinosa e coloração amarelada denominada estilete cristalino, cuja função é auxiliar a digestão. O intestino termina no ânus, que se localiza na câmara cloacal, próximo ao músculo adutor, no qual ocorre uma maior concentração de resíduos acumulados (NASCIMENTO et al., 2011).

O alimento provém de um fluxo de água, que passa através das cavidades do manto, pelas brânquias, que funcionam como um filtro e concentram partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal. A capacidade filtradora de uma ostra pode variar entre 19 a 50 L de água por hora, com alguma ou nenhuma capacidade seletiva (LEE; PANICKER; BEJ, 2003; NASCIMENTO et al., 2011).

Por essa característica, a microbiota presente nos moluscos bivalves é variável, tornando-se dependente da qualidade da água no qual é capturado e/ou cultivado, bem como da qualidade da água utilizada nas etapas de lavagem e processamento, além da estocagem e manipulação. São reservatórios de inúmeros patógenos humanos, entre eles o gênero *Salmonella* e algumas estirpes de *Escherichia coli* (MORRISON et al., 2011).

A capacidade de bioacumulação dos moluscos bivalves caracteriza-os como bioindicadores de alterações ambientais, assim como biomarcadores para o monitoramento de contaminação no ambiente aquático (RODRIGUES et al., 2009).

A presença de microrganismos patogênicos nos moluscos bivalves pode resultar no aparecimento de doenças veiculadas por alimentos (DVA) que podem ser causadas tanto por um agente infeccioso presente no alimento ingerido, como pela toxina pré-formada (VIEIRA et al., 2008).

A capacidade de serem veiculadores de doenças está associada ao costume cultural de algumas regiões em consumi-los crus ou levemente cozidos, sendo relatados frequentemente casos de intoxicação e infecção alimentar (NASCIMENTO et al., 2011). No Brasil, não existem limites para a presença de *Escherichia coli* em moluscos bivalves para consumo in natura, apenas para produtos à base de pescados não consumidos crus (BRASIL, 2001), contudo foi criado o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) que estabelece critérios microbiológicos as áreas de cultivo, onde < 230 NMP/100 g de *Escherichia coli* a área está liberada e > 46.000/100 g torna-se proibida para o cultivo de moluscos destinados ao consumo. Valores de *Escherichia coli* entre > 230 e < 46.000 a área se encontra liberada sob condição, ou seja, é necessário passar por um processo de depuração para redução da carga microbiana (BRASIL, 2012).

Os moluscos bivalves representam um dos grupos de maior importância econômica para as comunidades ribeirinhas que vivem próximas aos manguezais, uma vez que a coleta desses animais se constitui ou complementa a principal fonte de renda das famílias (ARAUJO et al., 2009).

3. DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

As doenças relacionadas ao consumo de alimentos têm sido relatadas com maior frequência e um dos motivos para esse crescimento é a subnotificação em relação aos surtos de Doenças Veiculadas por Alimento (DVA). A falta de um diagnóstico rápido e preciso, bem como a falta por auxílio médico, em casos onde a vítima apresenta sintomas clínicos de forma branda dificulta a notificação dessas doenças por parte da vigilância em saúde (MARCHI et al., 2011). Em muitos países, até mesmo no Brasil, os surtos notificados são aqueles que envolvem um grande número de pessoas ou ainda quando os sintomas se tornam prolongados (OLIVEIRA et al., 2010).

Mundialmente as DVA são importantes porque resultam em morbidade e mortalidade. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), dentre os patógenos que estão envolvidos em surtos alimentares se destacam *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *Brucella* spp. resultando em quase 333 mil casos de infecções crônicas entre os anos de 1990 a 2012 envolvendo esses microrganismos (KIRK, 2015).

Salmonella spp. tem sido um dos principais patógenos envolvidos em surtos alimentares destacando-se os sorotipos *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi. Estes

sorotipos estiveram envolvidos entre os anos de 1990 a 2012 em mais de 6,43 milhões de casos. Isso demonstra a relevância clínica de infecções causadas por *Salmonella* spp. e a urgência de controle (CRUMP; HEYDERMAN, 2014).

De acordo com o Centro Norte-Americano para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) mariscos e peixes têm sido envolvidos em 10% de todos os surtos de DVA e em 5% dos casos individuais, sendo que, dos surtos ocorridos, a maioria esteve relacionado com o consumo de moluscos bivalves (OLGUNOGLU, 2012).

No Brasil, no ano de 2009, as doenças infecciosas e do aparelho digestório foram responsáveis por 17,29% do total de casos de internamento, ocorrendo principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (BRASIL, 2010).

Pereira et al. (2010), relataram a presença de *Escherichia coli* em 58,8% das amostras analisadas de moluscos bivalves processados na Baía do Iguape-Ba. Santos et al. (2015) por sua vez relatou a presença de *Salmonella* spp. em 17% das amostras de água coletadas do estuário de Taperoá-Ba, em uma área de cultivo.

Uma alternativa para minimizar a elevada carga microbiana seria a depuração, processo que tem como objetivo reduzir o número de microrganismos patogênicos que podem estar presentes nos moluscos bivalves coletados em áreas contaminadas. Com esse processo o número de microrganismos presentes nos moluscos bivalves torna-se aceitável para o consumo (FAO, 2014).

4. GRUPO COLIFORME

Os coliformes totais são um grupo de bactérias bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativa, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície. Fermentadores de lactose produzem ácidos, aldeídos e gás a 35°C em 24 - 48 horas e são representados pelos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiela*. O grupo dos coliformes termotolerantes ou coliformes que crescem a 45°C é um subgrupo dos coliformes totais, restrito as espécies capazes de fermentar a lactose em 24 h a 44,5 – 45°C com produção de gás, como *Escherichia coli* (RATTI et al., 2011).

Os coliformes totais e termotolerantes em alimentos são utilizados como indicadores de qualidade sanitária durante a obtenção, transporte, processamento e estocagem dos produtos. A presença de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* está relacionada com a qualidade do produto além de indicarem condições inadequadas de higiene (TEJADA et al., 2012).

Na Resolução da Anvisa nº 12 de 02 de janeiro de 2001 não existe limite para *Escherichia coli* quanto ao consumo in natura de moluscos (BRASIL, 2001).

Apesar da legislação brasileira não possuir um limite para coliformes totais nos alimentos, a presença desses microrganismos não deve ser ignorada, porque nesse grupo se encontram mais de 20 espécies, tanto de bactérias oriundas do trato gastrointestinal do homem, como de animais de sangue quente, que podem retratar a qualidade higiênica do alimento (SILVA et al., 2010).

5. O GÊNERO *Escherichia*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae que morfológicamente é considerada um bacilo Gram negativo, não formador de esporos, anaeróbicos facultativos, com capacidade de fermentar glicose com produção de ácido e gás em 24 h (RODRIGUES et al., 2008; SILVA et al., 2010).

É encontrada no solo, na água e na microbiota de animais de sangue quente, incluindo os seres humanos. Dessa forma, esse microrganismo é considerado o principal indicador de contaminação de origem fecal e por isso tem um papel importante na contaminação de alimentos por pertencer naturalmente a microbiota entérica humana (MERCK, 2010).

Santos et al. (2015) relataram a presença da bactéria *Escherichia coli* em 100% das amostras de ostras cultivadas no estuário de Taperoá, Bahia. Enquanto no estuário de Graciosa, na mesma região, a bactéria foi confirmada apenas em 16,7% das amostras de água e em 33,3% das amostras de ostras. Por não fazer parte da microbiota dos moluscos bivalves, a presença de *Escherichia coli* nesses organismos está normalmente associada à contaminação fecal da água no local de captura ou durante o transporte e manipulação. Dessa forma, dejetos provenientes de águas residuais de esgotos podem contaminar o ambiente estuarino onde habitam os moluscos, acarretando na contaminação destes organismos (AUSTIN, 2010).

A maioria das cepas de *Escherichia coli* não é patogênica, entretanto, algumas espécies patogênicas tem sido a causa mais comum de infecções adquiridas no trato urinário (ITU), envolvida com maior frequência em sepse, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. São também causadoras de meningite neonatal, infecções intra-abdominais, pneumonia, diversas infecções dos tecidos moles e osteomielite (RILEY, 2014).

As estirpes de *Escherichia coli* associadas às infecções intestinais são divididas em seis patotipos: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (RODRIGUES et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) tem sido a maior causa de diarreia em crianças com idade inferior a um ano de idade em países em desenvolvimento. Dentre os vários sorotipos de EPEC, os retratados no meio brasileiro são os tipos O:111:H2, O:119:H6, O:55:H6 e O:86:H34 (JOHNSON et al., 2008).

As linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) estão relacionadas a surtos epidêmicos de diarreia em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, sua frequência ainda é muito baixa. A maioria dos surtos de infecções por EHEC é causada por amostras do sorotipo O:157:H7. No entanto, mais de 100 sorotipos de *Escherichia coli* produtoras de toxinas Shiga *Stx1* e *Stx2* já foram associados à colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica (SHU). Os sorotipos mais frequentemente associados a humanos são O:103:H2, O:111:NM, O:111:H8, O:113:H21 e O:26:H11 (RODRIGUES et al., 2008; RILEY, 2014).

As espécies de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) são sorotipos de *Escherichia coli* que produzem as toxinas LT (termolábil) e/ou ST (termoestável). Estão associadas a vários sorotipos, sendo os mais frequentes O:6:H:16 e O:78:H:12. A toxina LT apresenta estrutura e função semelhantes à toxina colérica, assim, este patotipo se parece com *Vibrio cholerae*, pois se adere à mucosa do intestino delgado causando diarreia sem invadir a mucosa e produzindo toxinas que agem nas células da mucosa (CROXEN; FINLAY, 2010).

As estirpes de *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC) e *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), são responsáveis por provocarem em humanos febre e diarreias aquosas, as quais podem apresentar sangue e/ou muco (CROXEN; FINLAY, 2010; SILVA et al., 2011). As espécies de *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) também podem causar diarreias, porém sua patogenia ainda não é bem definida. Alguns autores reconhecem a DAEC como uma categoria independente, potencialmente causadora de diarreia, mas pouco se sabe de sua patogênese (CROXEN; FINLAY, 2010).

Entre as escolhas terapêuticas para o tratamento de *Escherichia coli* estão os antimicrobianos β -lactâmicos e as fluoroquinolonas. O uso indiscriminado e aleatório desses medicamentos tem acarretado no aumento de resistência microbiana, dificultando o tratamento das infecções (ROLAIN, 2013).

6. O GÊNERO *Salmonella*

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, móveis em sua grande maioria devido à presença de flagelos peritríquios. Crescem em uma faixa de temperatura de 5°C a 46°C, com crescimento ótimo a 37°C. Crescem bem em pH entre 3,8 a 9,5, sendo 7,0 o pH ideal. Sua atividade de água (A_w) mínima para crescimento é de 0,94 (SILVA et al., 2010).

A classificação taxonômica deste gênero é dividida em duas espécies *Salmonella bongori* com 23 sorovares conhecidos e *Salmonella enterica* com mais de 2.580 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010). *Salmonella* spp. é amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada principalmente no trato intestinal do homem e de animais de sangue quente e frio, com exceção dos peixes, moluscos e crustáceos, que podem se contaminar após a pesca ou captura. Essa bactéria é considerada um dos mais importantes patógenos causadores de infecções de origem alimentar, por apresentar uma dose infectante baixa de 10^5 a 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Os sorotipos que mais acometem os seres humanos são *Salmonella* sorotipo Enteritidis e *Salmonella* sorotipo Typhimurium, sendo estes responsáveis por 75% dos casos das doenças. *Salmonella* sorotipo Enteritidis é muito associada ao consumo de produtos aviários, particularmente ovos, enquanto, *Salmonella* sorotipo Typhimurium está relacionada à contaminação dos demais alimentos de origem animal, inclusive moluscos bivalves (BOXSTAEL et al., 2012).

A maioria dos casos de salmonelose em humanos provoca gastroenterite auto-limitante caracterizada por diarreia, febre e cólicas abdominais, não sendo necessária a utilização de terapia antimicrobiana, embora em casos mais graves de infecções sistêmicas seja necessário o uso de antimicrobianos (DE SOUZA et al., 2010; BOXSTAEL et al., 2012).

O consumo in natura de moluscos bivalves, como ostras, pode representar um perigo à saúde do consumidor, sendo necessário o monitoramento da sua qualidade microbiológica, bem como das áreas de cultivo e, principalmente, dos pontos de comercialização, tendo em vista que a estocagem inadequada pode elevar os níveis de contaminação (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Segundo a legislação brasileira deve haver ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de moluscos bivalves tanto in natura quanto cozido (BRASIL, 2001).

7. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos composto por substâncias sintéticas, semissintéticas ou naturais com atividade antimicrobiana, podendo ser administrados aos seres humanos e animais para diversos fins, como tratamento de infecções, prevenção e promotores de crescimento (ROLAIN, 2013).

De acordo com a suscetibilidade antimicrobiana, especificamente de bactérias, podem ser classificadas em sensíveis, quando a dose do antimicrobiano é apropriada para tratar determinada infecção; intermediária significa que o microrganismo apresenta moderada resistência, necessitando de uma dose mais alta do medicamento utilizado e resistentes indicando que a infecção causada pela bactéria não responde ao tratamento com o agente antimicrobiano, resultando em tratamentos ineficazes, infecções persistentes e a possibilidade de transmissão da característica de resistência para outros microrganismos (CLSI, 2010; WHO, 2012).

No Canadá, a utilização de agentes antimicrobianos é limitada e regulamentada, em virtude do uso abusivo desses medicamentos (WEIR et al., 2012). No Brasil também há regulação para o uso de antimicrobianos, regulamentado pela RDC N°. 20/2011, que proíbe a comercialização de antimicrobianos no país sem apresentação de receita médica (BRASIL, 2011).

O uso abusivo e prolongado de antimicrobianos no setor agropecuário, na medicina humana, veterinária e o descarte em esgotos sem tratamento adequado têm ocasionado o aumento de microrganismos resistentes (MANJUSHA; SARITA, 2013).

O desenvolvimento de patógenos resistentes como *Salmonella* sorotipo Typhi, estirpes patogênicas de *Escherichia coli* e o uso indiscriminado de antimicrobianos, tem ocasionado preocupação do ponto de vista da saúde pública, visto que as bactérias resistentes têm sido transmitidas aos seres humanos através de alimentos de origem animal, reduzindo a eficácia da droga utilizada (HARADA; ASAI, 2010).

A presença de resíduos de antibióticos favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado, bem como a transferência de genes de resistência às bactérias da microbiota nativa ou potencialmente patogênica para os seres humanos. O ambiente aquático é considerado o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para a

troca de genes de resistência, devido ao recebimento de quantidades significativas de antimicrobianos por meio da eliminação de águas residuais e esgotos, resultante da medicação em humanos, efluentes hospitalares, bem como antimicrobianos para o uso veterinário (ZHENG et al., 2011).

A resistência antimicrobiana pode ser determinada por características intrínsecas às células, determinada por genes cromossômicos, embora, alguns microrganismos possam sofrer mutações em seu material genético, receber plasmídeos ou transposons, genes cassetes ou outros elementos genéticos móveis e desse modo adquirir uma resistência, cuja transmissão entre as bactérias, pode ocorrer entre os indivíduos do mesmo grupo ou em diferentes grupos taxonômicos e ecológicos, contribuindo para a difusão de genes de resistência no ambiente (LAJNEF et al., 2012).

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA de fita dupla, circulares, auto-replicativas, não pertencentes ao cromossomo bacteriano principal. Podem ser transferidos de uma bactéria a outra, e com isso transferir determinadas características como, resistência aos antibióticos, tolerância a metais tóxicos, produção de toxinas e síntese de enzimas (TORTORA et al., 2012; IREDELL; BROWN; TAGG, 2016).

Alguns sorotipos de *Salmonella* podem apresentar genes de resistência inseridos em seu genoma, conferido resistência e multirresistência aos antibióticos (BOXSTAEEL et al., 2012). Dessa forma, acredita-se que a utilização indiscriminada de drogas antimicrobianas não somente para o tratamento de doenças na medicina humana e veterinária, mas também para melhorar os índices zootécnicos dos animais de produção têm contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes, tornando-se um problema grave para a saúde pública (HUR; JAWALE; LEE, 2012).

Na China, Yan et al. (2010) em um estudo realizado com mariscos descreveram sorotipos de *Salmonella* resistentes as diversas classes antimicrobianas como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, nitrofuranos, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas, demonstrando ainda padrões de multirresistência de dois até 10 antimicrobianos. Bouchrif et al. (2009) isolaram diversos sorotipos de *Salmonella* em Marrocos e observaram resistência a tetraciclina, ácido nalidíxico, ampicilina e estreptomicina.

Ao analisar a suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de camarão e ambientes de carcinicultura, Vieira et al. (2010) detectaram 33% de resistência para tetraciclina.

Evangelista-Barreto et al. (2012) relataram cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado na cidade de Cruz das Almas, BA, resistentes aos antimicrobianos eritromicina,

amicacina, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol. Segundo os autores esses antimicrobianos são comumente utilizados no tratamento de infecções em humanos.

7.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos da família β -lactâmico (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e manobactâmicos) apresentam um anel β -lactâmico essencial para a atividade antibacteriana, sendo estes os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana, pela eficácia e segurança. Dessa forma, frequentemente é observado resistência a esta classe de antimicrobianos, devido à presença de enzimas β -lactamases, as quais rompem cataliticamente o anel β -lactâmico, formando o ácido penicilóico sem ação terapêutica. Antimicrobianos β -lactâmicos bactericidas inibem a síntese da parede celular por meio da interferência na síntese de peptídeoglicano, constituinte essencial para a manutenção da parede celular bacteriana, com isso a parede celular não é corretamente formada, promovendo a lise celular (PONTES et al., 2009).

A classificação das β -lactamases é realizada a partir das classificações propostas por Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros, baseadas na preferência de substrato e inibidores específicos de β -lactamases. Na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, as enzimas de Espectro Estendido (ESBL) pertencem ao grupo 2be (enzimas do tipo TEM, SHV e CTX-M) ou ao grupo 2d (ESBL do tipo OXA). O esquema de classificação de Ambler considera a semelhança entre as cadeias de aminoácidos das enzimas e são agrupadas em quatro tipos A, B, C e D, de modo que as enzimas do tipo ESBL (TEM, SHV e CTX-M) pertencem à classe A de Ambler, exceto as da família OXA, que pertencem à classe D. As enzimas que contém serina em seu sítio ativo pertencem ao grupo A, C e D, enquanto as metaloenzimas pertencem ao grupo B, contendo em seu sítio ativo o zinco (AMBLER, 1991; BUSH, JACOBY; MEDEIROS, 1995).

A presença de serina nos sítios de ação desempenha importante papel na atividade de espectro estendido das β -lactamases, porque a enzima associa-se ao anel β -lactâmico, o qual é atacado pela hidroxila livre ao lado do sítio ativo do resíduo de serina, que resulta na formação de um grupo acil-éster, e então a hidrólise libera a enzima ativa e o antimicrobiano hidrolisado inativo, formando água e ácido peniciloico (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

As enzimas do tipo TEM são muito importante entre as β -lactamases de espectro restrito, com atividade hidrolítica contra cefalosporinas de primeira geração e muitas penicilinas, sendo a enzima TEM-1 a primeira variante descrita. Alterações específicas em

uma determinada sequência de aminoácidos, ou seja, mutações pontuais no gene *bla*TEM-1 resultam em enzimas com espectro estendido, que determinam a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima e ceftazidima (BUSH, 2010).

As β -lactamases tipo SHV são enzimas extremamente disseminadas entre as enterobactérias provenientes de resíduos hospitalares, que podem atingir o meio aquático por meio de lançamentos de esgotos. Entre as enzimas SHV, a SHV-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada, sendo de espectro restrito, apresentando atividade sobre penicilinas e cefalosporinas de primeira geração. As ESBLs tipo SHV são originadas de mutações pontuais no gene *bla*SHV-1 ou seus variantes, as quais codificam a substituição de um a sete aminoácidos na sequência, que levam a modificação do sítio ativo da enzima e aumenta seu espectro de ação para alcançar a maioria das cefalosporinas de terceira geração (BUSH, 2010).

As ESBLs tipo CTX-M, codificada pelo gene *bla*CTX-M, são enzimas que possuem alta capacidade em hidrolisar ceftazidima e cefotaxima, sendo encontradas com frequência em espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente na Europa e em alguns países da América do Sul. São classificadas em cinco grupos de acordo com a semelhança entre suas sequências de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. O grupo CTX-M-1 inclui as enzimas (CTX-M-3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57). O grupo CTX-M-2 (CTX-M-2, -4, -7, -20, -31 e -44). O grupo CTX-M-8 (CTX-M-8, -40 e -63). O Grupo CTX-M-9 (CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45 a -50). O grupo CTX-M-25 inclui as enzimas CTX-M-25, -26, -39 e -41 (CANTON; COQUE; 2006; ELLINGTON, 2007).

Shahada et al. (2010), após caracterização molecular mostrou que o perfil de multiresistência de *Salmonella* sorotipo Infantis estava associado a presença do gene *bla*TEM, que caracteriza resistência a ampicilina, cefalotina, ceftazidime e cefotaxime (as duas últimas cefalosporinas de 3ª geração).

Zioga et al. (2008) relataram a existência simultânea do gene *bla*CTX-M2 codificador de β -lactamase no cromossomo e em plasmídeo conjugativo de cepas de *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium, responsáveis por conferir resistência as cefalosporinas de espectro estendido.

As enzimas de Espectro Estendido (ESBL) apresentam resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro, antimicrobianos que normalmente possuem atividade contra bactérias Gram-negativas. As ESBL hidrolisam penicilinas, aztreonam e cefalosporinas de terceira geração e são inibidas pelos inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico. São

enzimas importantes, pois sua produção envolve um dos mecanismos de resistência que ameaçam a terapia antimicrobiana das infecções causadas pelas enterobactérias (PONTES et al., 2009)

Os antimicrobianos β -lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, como meropenem e imipenem são utilizados como alternativas para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas resistentes ou multiresistentes produtoras de ESBL. A presença do anel carbapenêmico permite a ação dessas substâncias atuarem de forma eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à existência de uma cadeia hidroxietila que confere suposta estabilidade dessas drogas na presença de β -lactamases (FIGUEREDO et al., 2009).

Nos últimos anos tem sido preocupante o aumento crescente de resistência e multiresistência aos antimicrobianos em bactérias ambientais, levando em consideração que a presença de genes de resistência favorece a disseminação, transmissão e propagação da resistência à diversas drogas, tornando-se um problema de saúde pública (LAJNEF et al., 2012).

REFERÊNCIAS

AMBLER, R. P.; COULSON, A. F.; FRÉRE, J. M.; GHUYSEN, J. M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S.G. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, Londres, v. 15, p. 269-272, 1991.

ARAÚJO, A.R.R.; SILVA, F.D.; SANTANA, R.F.; LOPES, D.F.C. Gestão da pesca de *Mytella charruana* (D' ORBIGNY, 1846) no litoral do estado de Sergipe: indicadores de sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Pesca**, São Luís, v. 4, n. 2, p. 56-70, 2009.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 310-317, 2010.

BAHIA PESCA. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. **Aquicultura marítima 2012. Base de dados**: <http://www.bahiapesca.ba.gov.br/aquicultura-maritima>. Acesso: 03 fevereiro de 2016.

BOUCHRIF, B.; PAGLIETTI, B.; MURGIA, M.; PIANA, A.; COHEN, N.; ENNAJI, M.; RUBINO, S.; TIMINOUNI, M. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. **Journal of Infection in Developing Countries**, Tramariglio, v. 3, n. 28, p. 35-40, 2009.

BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan.2001.

BRASIL. Resolução-RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos. DOU Nº 87, Seção 1, p. 39-41. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da pesca e aquicultura, Instrução normativa interministerial n. 7 de 08 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 55-59, 09 de maio. Seção 1, pt 1, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Indicadores de morbidade**. Brasília: Departamento de Informática do SUS (DATASUS), 2010. Base de dados: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/d13.def>>. Acesso 08 dezembro de 2015.

BOXSTAEEL, S. V.; DIERICK, K.; VAN HUFFEL, X.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; HERMAN, L.; BERTRAND, S.; WILDEMAUWE, C.; CATRY, B.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and human in Belgium between 2001 and 2006. **Food Research International**, Barking, v. 45, p.913-918, 2012.

BUSH, K. Bench-to-review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, Orlando, v. 14, p. 224, 2010.

BUSH, K., JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 39, p.1211-1233, 1995.

CANTON, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.9, p.466-75, 2006.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2010) Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; approved Guideline. <http://clsi.org/blog/2015/01/08/clsi-publishes-new-antimicrobial-susceptibility-testing-standards/>.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v.8, p. 20-38, 2010.

CRUMP, J. A.; HEYDERMAN, R. S. Invasive *Salmonella* infections in Africa. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.108, p.673-675, 2014.

DE SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

ELLINGTON M. J.; KISTLER J.; LIVERMORE D. M.; WOODFORD N. I. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 59, p. 321-322, 2007.

EVANGELISTA - BARRETO, N. S.; MOURA, F. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; ASSIM, D. A.; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 3, p.86-95, 2012.

FIGUEIREDO, D. Q. de, CASTRO, L. F. S., SANTOS, K. R. N., TEIXEIRA, L. M.; MONDINO, S. S. B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. El estado mundial de la pesca e acuicultura (2014) (SOFIA). Base de dados: Disponível em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//docrep/007/y5600s/y5600s04.htm@P376_27339>. Acesso: 02 fevereiro de 2016.

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

HARADA, K.; ASAI, T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2010, 2010.

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.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Base de dados: Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso: 10 dezembro de 2015.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 3987-3996, 2008.

KIRK, M. D.; PIRES, S. M.; BLACK, R. E.; CAIPO, M.; CRUMP, J. A.; JOHN, A. Crump, DEVLEESSCHAUWER, B.; DOPFER, D.; FRASIL, A.; FISCHER-WALKER, C. L.; HALD, T.; HALL, A. J.; KEDDY, K. H.; LAKE, R. J.; LANATTA, C. F.; TORGERSON, P. R.; HAVELAAR, A. H.; ANGULO, F. J. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A Data Synthesis. **Plos medicine**, California, v. 12, 2015.

LAJNEF, R., SNOUSSI, M., ROMALDE, J. L., NOZHA, C., & HASSEN, A. Comparative study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from four Tunisian marine biotopes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 3345-3363, 2012.

LEE, C.Y.; PANICKER G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 199-209, 2003.

MANJUSHA, S.; SARITA, G. B. Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. **International Food Research Journal**, Barking, v. 20, n. 1, p.77-86, 2013.

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 Serviço de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 401-407, 2011.

MERCK. **Manual Merck de informação médica**. São Paulo: Roca, 2010, 1944p. Base de dados: Disponível em: <http://www.manualmerck.net/>. Acesso: 02 janeiro de 2016.

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, 2011.

NASCIMENTO, V. A.; MITTARAQUIS, A. S. P.; TRAVÁLIA, B. M.; SANTOS, R. C. A.; NUNES, M. L.; AQUINO, L. C. L. Qualidade Microbiológica de moluscos bivalves - sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2011.

OLGUNOGLU, I. A. **Salmonella in Fish and Fishery Products, Salmonella - A dangerous food borne pathogen**. Base de dados: Disponível em: Available from: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/salmonella-in-fish-andfishery-products>. p. 91-105, 2012. Acesso: 02 janeiro de 2016.

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 Hospital de Clinicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v.30, n.3, p.279-285, 2010.

PEREIRA, A. F.; SILVA, I. P.; BARBALHO – FERREIRA, L. T.; SILVEIRA, C. S.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Avaliação da qualidade microbiológica do sururu do mangue, *Mytella guyanensis* na Baía do Iguape, Maragogipe – Ba. In: REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIENCIA, 2010, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: UFRB, p. 930, 2010.

PEREIRA, M. M. D.; FERREIRA, V. M.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M.; ALENCAR, T. A.; RIBEIRO, A. C. M. S.; SILVA, P. P. O.; BARBOSA, C. G. Análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guaíba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 95-99, 2009.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 54, p. 24-38, 2010.

PONTES, D. S.; PINHEIRO, F. A.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; GUEDES, R. L. M.; CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F. R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic asunder distinct anthropogenic influence in a tropical region. **Microbial Ecology**, Nova Iorque, v. 58, n.4, p. 762-772, 2009.

RAHIMI, E. H.; SHAKERIAN, A.; FALAVARJANI, G. A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, v. 22, n.1, p. 59-62, 2013.

RATTI, B. A; BRUSTOLIN, C. F; SIQUEIRA. T. A; TORQUATO, A. S. Pesquisa de Coliformes totais e fecais em amostras de água coletadas no Bairro Zona Sete, na cidade de Maringá. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Maringá. **Anais...** Maringá, p. 978, 2011.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extra intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 20, p. 380-390, 2014.

RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D.; REIS, E. M. F.; LAZARO, N. S. Doenças de Transmissão Alimentar: Aspectos Clínicos, Coleta e Transporte de Material. **Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**, Lab. Ref. Nacional Cólera e outras Enteroinfecções. Man. Lab. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. p. 27. 2008.

RODRIGUES, L. de A.P. **Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía de Todos os Santos**. 2009. 174f. (Dissertação). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ROLAIN, J. M. Food and human gut reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2013.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, 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**, Bahia, v. 47, p. 190-196, 2010.

SANTOS S. S.; BARRETO L. M.; SILVEIRA C. S.; REIS N. A.; LIMA K. A.; DE SOUZA J. S.; EVANGELISTA-BARRETO N. S. Condições sanitárias de ostras produzidas e comercializadas em Taperoá, Bahia e o efeito da depuração na redução da carga microbiana, **Actapesca**, v. 3, p. 49-60, 2015.

SHAHADA, F.; SUGIYAMA, H.; CHUMA, T.; SUEYOSHI, M.; OKAMOTO, K. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 136-144, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

TEJADA, T.S; DIAS, P. A; CONCEIÇÃO, R. C. S; TIMM, C. D. Micro-organismos patogênicos e deteriorantes em chocolate artesanal ao leite. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, p. 178-181, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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, R. H. S. F. Normas e padrões microbiológicos para o pescado. In: **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**, São Paulo, p. 203, 2010.

WEIR, M.; RAJIC, A.; DUTIL, L.; UHLAND, C.; BRUNEAU, N. Zoonotic bacteria and antimicrobial resistance in aquaculture: Opportunities for surveillance in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 619-620, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **10 Facts on Antimicrobial resistance. 2012.** Base de dados: Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html. Acesso: 22 fevereiro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. **Drug-resistance *Salmonella*, 2005.** Base de dados: Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso: 11 fevereiro de 2016.

YAN, H.; LI, L.; ALAM, M. J.; SHINODA, S.; MIYOSHI, S.; SHI, L. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n.3, p. 230-234, 2010.

ZHENG, S.; QIU, X.; CHEN, B.; YU, X.; LIU, Z.; ZHONG, G.; LI, H.; CHEN, M.; SUN, G.; HUANG, H.; YU, W.; FREESTONE, D. Antibiotics pollution in Jiulong river estuary: source, distribution and bacterial resistance. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n. 11, p. 677-1685, 2011.

ZIOGA, A.; WHICHARD, J. M.; JOYCE, K. J.; TZELEPI, E.; TZOUVELEKIS, L. S.; MIRIAGOU, V. Evidence for chromosomal and plasmid location of CMY-2 cephalosporinase gene in *Salmonella* serotype Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v.61, p.1389-1399, 2008.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA EM DOIS ESTUÁRIOS DA REGIÃO DO BAIXO SUL, BAHIA

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA EM DOIS NA REGIÃO ESTUÁRIOS DO BAIXO SUL, BAHIA

IDENTIFICATION AND PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTENCE ENTEROBACTERIA ISOLATED BIVALVE MOLLUSCS STRENGTH AND WATER IN TWO ESTUARIES SOUTH DOWN, BAHIA

Noely Marques Ferreira-Grise¹, Vaneza Cardoso Leal¹, Iara Fonseca Souza¹, Elizabeth Amélia Alves-Duarte², Thiago Alves Santos de Oliveira³, Norma Suely Evangelista-Barreto⁴

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental - UFRB

²Professora Colaboradora - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB,

³Pós-doutorando Centro de Ciências Ambientais e Biológicas,

⁴Professora Adjunto - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em ostras de cultivo e de extrativismo em dois estuários do Baixo Sul da Bahia e verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Foram realizadas seis coletas de ostras e água durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016. Para a suscetibilidade antimicrobiana utilizou-se 15 fármacos e a produção de enzimas β -lactamases verificada por meio de testes fenotípicos e genotípicos (*bla*TEM-1, *bla*CTX-M e *bla*SHV). No estuário de Taperoá (extrativismo) as ostras apresentaram densidade microbiana máxima de coliformes a 35°C de 3,30 log NMP/100 g e a 45°C de 3,15 log NMP/100 g. No estuário de Torrinhas a densidade microbiana máxima de coliformes a 35°C e a 45°C na água foi de 2,85 log NMP/100 mL e 2,50 NMP/100 mL, respectivamente e nas amostras de ostras de 2,65 log NMP/100 g e 2,30 log NMP/100 g, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre as amostras. *Escherichia coli* foi isolada em 50% das amostras de água e 67% das amostras de ostras de extrativismo. Não foi observada a presença de *Salmonella* em qualquer das amostras. *Escherichia coli* provenientes da água do estuário de Torrinhas apresentaram apenas perfil intermediário de resistência antimicrobiana (57,14%), enquanto os isolados das ostras de extrativismo apresentaram resistência antimicrobiana de 60% e 20% de resistência intermediária, com maior resistência verificada aos β -lactâmicos (71,42%). Perfil de multiresistência (40%) foi observado apenas para *Escherichia coli* isoladas das ostras de extrativismo, com índice de múltipla resistência (MAR) variando de 0,13 a 0,20. Quanto a origem gênica da resistência, esta foi equivalente entre plasmidial e cromossômica (50%), sendo que as cepas isoladas da água apresentaram maior percentual de resistência plasmidial (62,50%). Fenotipicamente não foi observada a produção de enzimas β -lactamases. A presença dos genes *bla*TEM-1 e *bla*CTX-M foi observada em 83,33% e 8,33% das cepas de *Escherichia coli*, respectivamente. Não foi observada a presença do gene

blaSHV. A presença de *Escherichia coli* contendo genes de resistência nos estuários faz com que os moluscos bivalves comercializados na região atuem como veículo de bactérias resistentes para o ser humano.

Palavras chaves: *Escherichia coli*, ostras, saúde pública, suscetibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT:

This study aimed to verify the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in cultivation of oysters and extraction in two estuaries of Southern Bahia and check the antimicrobial susceptibility. Were carried out six collections of oysters and water during the period from June 2015 to January 2016. For antimicrobial susceptibility was used 15 drugs and the production of β -lactamase enzymes verified by phenotypic testing and genotypic (*bla*TE-1, *bla*CTX-M and *bla*SHV). At estuary Taperoá (extraction) oysters showed maximum microbial density coliforms at 35°C of 3.30 log NMP/100 g at 45°C of 3.15 log NMP/100 g. At estuary Torrinhas maximum microbial density coliforms at 35°C and 45°C in the water was 2.85 log NMP/100 ml and 2.50 NMP/100 ml respectively and samples oyster 2.65 log NMP/100 g and 2.30 log NMP/100 g, respectively, were not statistically different between the samples. *Escherichia coli* was isolated in 50% of water samples and 67% of the samples for extraction of oysters. It was observed the presence of *Salmonella* in any of the samples. *Escherichia coli* from water Torrinhas estuary showed only antimicrobial resistance intermediate profile (57.14%), while isolates of extractive antimicrobial resistance oysters showed 60% and 20% intermediate resistance with greater resistance observed at β -lactams (71.42%). multidrug resistance profile (40%) was only observed for *Escherichia coli* isolated from the extraction of oysters, with multiple resistance index (MAR) ranging from 0.13 to 0.20. The gene source of resistance, this was equivalent between plasmid and cromossômia (50%), and the strains of the water showed a higher percentage of plasmid resistance (62.50%). Phenotypically was not observed the production of β -lactamase enzymes. The presence of *bla*TEM-1 and *bla*CTX-M genes was observed at 83.33% and 8.33% of the strains of *Escherichia coli*, respectively. It was observed the presence of *bla*SHV gene. The *Escherichia coli* containing genes resistance in estuaries causes the bivalve molluscs marketed in the region acting as vehicle-resistant bacteria in humans.

Key words: antimicrobial susceptibility, *Escherichia coli*, oysters, public health.

Introdução

Os estuários são ambientes com características físicas e químicas únicas, capazes de albergar inúmeras espécies aquáticas. Entretanto, vêm sofrendo com a degradação ambiental ocasionada pela influência antrópica, assim como o lançamento de esgotos doméstico e industrial o que favorece a alteração da microbiota natural do ambiente (SANDE et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011). A contaminação das águas influencia de forma direta a qualidade dos recursos pesqueiros e organismos utilizados na alimentação, podendo ocasionar surtos alimentares (OLIVEIRA et al., 2010).

Dentre os produtos da pesca, os moluscos bivalves são muito apreciados devido sua importância nutricional, ou seja, fonte de proteína e minerais. Esses organismos têm despertado a atenção mundial, não só pelo aumento de sua produção e consumo, mas pelo fato de atuarem como indicadores biológicos de poluição de origem fecal nos locais onde são cultivados devido ao processo de alimentação por filtração, acumulando não apenas o fitoplâncton que compõe seu principal alimento, como também metais, pesticidas, biotoxinas e enterobactérias como *Salmonella* e *Escherichia coli*, amplamente relacionadas em surtos alimentares (SANDE et al., 2010). A ingestão destes organismos é considerada um risco devido ao hábito cultural de algumas regiões consumi-los crus ou levemente cozidos (NASCIMENTO et al., 2011).

Bactérias provenientes de contaminação de origem fecal, como os gêneros *Salmonella* e *Escherichia* estão entre os principais microrganismos veiculados pelos moluscos bivalves. *Salmonella* tem sido envolvida em diversos surtos gastrointestinais de ocorrência mundial. *Escherichia coli* é reconhecida como indicador de outros patógenos, de natureza bacteriana, viral ou parasitária, além de apresentar estirpes patogênicas como O157:H7 (MORRISON et al., 2011).

Outro problema ambiental envolvendo o consumo de alimentos crus tem sido o descarte inadequado de resíduos de antimicrobianos. O uso de antimicrobianos humano e veterinário ao serem excretados pelas fezes e urina ainda apresentam uma parcela significativa da droga em sua forma inalterada e ativa (ZHANG et al., 2015). Estes resíduos ao atingirem os estuários devido a falta de saneamento básico ou tratamento adequado da rede de esgoto contribuem para a alteração da microbiota autóctone pela disseminação de genes de resistência móveis entre as bactérias (MANJUSHA; SARITA, 2013).

A presença de resíduos de antimicrobianos no ambiente tem trazido sérias consequências negativas como ação sobre organismos não-alvo, contaminação dos alimentos e abastecimento de água potável, bem como o aumento da resistência microbiana (ZHANG et al., 2015).

Entre os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana estão os β -lactâmicos, cuja resistência microbiana está relacionada a produção de enzimas capazes de hidrolisarem o anel β -lactâmico (PONTES et al., 2009), como as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de terceira geração (BUSH, 2010).

Tendo em vista que a presença de bactérias resistentes de origem fecal em ambientes aquáticos, principalmente em áreas de colheita de moluscos bivalves, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em ostras de cultivo e de extrativismo, bem como verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados.

Material e Métodos

Descrição da área e coleta das amostras

O estuário de Taperoá que abriga o banco natural de ostras se encontra localizado no município de Taperoá, Baixo Sul da Bahia e banhado pelo rio das Almas com latitude 13°32'17"S e longitude 39°05'55"W. Sua população é estimada em 21.091 habitantes e possui uma área de 410.175 km². A cidade é originada de uma aldeia indígena, São Miguel de Taperaguá, fundada pelos jesuítas em 1561 (IBGE, 2010).

A comunidade de Torrinhás situada no município de Cairu, Bahia é banhada por um estuário que recebe vários braços de rios tendo como principal o rio Una, a uma latitude de 13°33'54.84"S e longitude 39°0'29.99"W. Cairu é uma ilha do arquipélago fluvial do rio Una, juntamente com Tinharé e Boipeba, cercada por manguezais e grande produtora de dendê. Torrinhás é uma comunidade remanescente de quilombolas, com aproximadamente 106 famílias de pescadores e marisqueiras. Sua população é estimada em 450 habitantes (IBGE, 2010).

Um dos fatores que contribui para a poluição das águas desses estuários é o fato dos municípios costeiros não disporem de sistema de tratamento de esgoto, lançando seus dejetos domésticos diretamente nos rios (SANTOS et al., 2015). Isso acarreta na contaminação dos organismos aquáticos, principalmente quando se trata de moluscos bivalves.

Durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016 foram realizadas seis coletas de ostras e água no estuário de Torrinhás, Baixo Sul, Bahia, das quais as três primeiras foram bimestralmente e o restante mensalmente. A água foi coletada em três diferentes pontos no entorno do cultivo de ostras, ponto P1 (13°34'39.576"S / 39°1'22.800"W) após o cultivo, sentido prier-cultivo, ponto P2 (13°34'23.196"S / 39°0'41.652"W) na área de cultivo e ponto P3 (13°34'23.664"S / 39°1'2.640"W), antes do cultivo, sentido prier-cultivo (Figura 1). E no estuário de Taperoá (13°32'43.8"S / 39°05'09.1"W) no mesmo período sob as mesmas condições, com exceção da maré, a coleta de ostras de cultivo era realizada com a maré cheia, para facilitar o acesso até o cultivo, enquanto que para obter as amostras de ostras de extrativismo a coleta era feita em condições de maré vazante. Nas três primeiras coletas observou-se que a quantidade de chuva foi maior quando comparadas com as demais.

Para as coletas de água foram utilizadas garrafas de vidro âmbar com capacidade de 1000 mL a uma profundidade média de 30 cm abaixo da superfície da água, no sentido contrário a correnteza. Os parâmetros de temperatura, pH e salinidade da água foram verificados "in loco", usando sonda multiparâmetro portátil modelo HI 9828. As amostras de ostras foram coletadas diretamente das lanternas do cultivo. Cada amostragem foi composta por 36 ostras escolhidas aleatoriamente, totalizando a análise de 216 ostras (Figura 2).

Para a amostragem de ostras de extrativismo esta foi composta por 120 ostras escolhidas aleatoriamente, totalizando a análise de 720 ostras (Figura 3).

Todas as amostras foram acondicionadas em gelo e transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, Brasil. No laboratório as ostras foram lavadas em água corrente com o auxílio de escovas e abertas assepticamente para a retirada do tecido muscular e líquido intervalvar, homogeneizadas e retirada as porções analíticas para a quantificação de coliformes totais (35°C) e termotolerantes (45°C), isolamento de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Análises microbiológicas

A quantificação de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada através da técnica de fermentação em tubos múltiplos com série de cinco tubos (SILVA et al., 2010). Para a análise pesou-se 25 g do músculo e

líquido intervalvar das ostras e homogeneizadas em 225 mL de solução salina 0,85%, correspondendo a diluição 10^{-1} . Demais diluições foram realizadas até 10^{-4} . Alíquotas de 1 mL foram adicionadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo tubos de Durham invertidos, e incubados por 48h a 35°C. Após esse período, um inóculo dos tubos positivos foi transferido para tubos contendo caldo Bile Verde Brilhante (CBVB) e caldo EC e incubados a 35°C por 48h e em banho-maria a 44,5°C por 24h, respectivamente. Decorrido esse período, alíquotas de tubos com EC positivos foram semeados em meio agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35°C por 24h para crescimento diferencial de *Escherichia coli* e posterior isolamento para identificação bioquímica por meio dos testes IMViC: Indol, VM (Vermelho de Metila), VP (Voges-Proskauer) e agar Citrato de Simmons. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de água com exceção do volume que foi de 25 mL.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizado o pré-enriquecimento das porções analíticas de 25 g ou 25 mL em 225 mL de Caldo Lactosado e incubadas a 35 °C por 24h. Em seguida, alíquotas foram inoculadas em tubos contendo Caldo Tetrionato e Caldo Rappaport-Vassilidis, incubados durante 24h a 35 °C e a 42 °C, respectivamente. Posteriormente alíquotas foram estriadas em placas de Petri contendo agar Hektoen (HE), agar *Salmonella-Shigella* (SS) e agar Verde Brilhante (BVA) (Silva et al., 2010). A identificação bioquímica e a sorologia foram realizadas de acordo com Silva et al. (2010).

Todos os meios de cultura utilizados para isolamento e identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. foram das marcas Himedia e Acumedia.

Suscetibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão de disco em placas, seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

Para o antibiograma, as colônias de *Escherichia coli* foram repicadas em meio Triptona Soja Ágar (TSA) (Himedia) inclinado e incubado a 37°C por 24h. Em seguida, uma alçada da cultura foi resuspensa em 9 mL de salina 0,85% até que a densidade bacteriana lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL) (CLSI, 2010). Após o ajuste, o inóculo foi espalhado no meio agar Mueller-Hinton (Himedia) e adicionado os discos de antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e posteriormente, seus halos de inibição medidos usando paquímetro digital (Digimiss®). Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), cefalotina (30 µg), ceftazidime (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), azetronam (30 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg), amicacina (30 µg), estreptomicina (10 µg), cefoxitina (30 µg) e ceftriaxona (30 µg), fabricados pelo Laborclin.

1. Múltipla resistência antimicrobiana

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (índice MAR) foi calculado como o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de antimicrobianos testados, multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentuais (HIRSCH et al., 2006).

Cura do plasmídeo

As cepas de *Escherichia coli* submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana e que apresentaram perfil de resistência foram submetidas a testes de cura plasmidial de acordo com Molina-Aja et al. (2002). Como agente de cura foi utilizado o agente mutagênico laranja de acridina (Sigma) na concentração de 100 µg/mL. A partir do crescimento bacteriano em meio agar TSA, foi transferido um inóculo da cultura para tubos de ensaio contendo caldo LB (Luria Bertani) suplementado com o agente de cura e incubados a 37°C por 24h em estufa bacteriológica. Em seguida, o antibiograma foi repetido para os antimicrobianos que o microrganismo apresentou resistência a fim de verificar se a característica de resistência era mediada por enzimas codificadas em plasmídeos ou cromossomos.

Produção de β-lactamases (βLs)

A cepa de *Escherichia coli* que apresentou resistência ao aztreonam, ceftriaxona e ceftazidima foi submetida ao teste de duplo disco difusão, contendo cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona e ceftazidima) e outro disco disposto a 20 mm de distância, contendo o inibidor de β-lactamase (amoxicilina + ácido clavilânico) (CLSI, 2010).

Foi realizada a padronização do inóculo para 10⁸ UFC/mL em espectrofotômetro, modelo Spectrum SP - 1105, com absorvância de 625 nm da cepa e em seguida a suspensão foi espalhada usando *swab* estéril em placas contendo 17 mL de agar Mueller-Hinton, em seguida foram adicionados os discos de antimicrobianos e incubadas a 37 °C por 24h.

Caracterização molecular de Escherichia coli e detecção de genes codificadores de β-lactamases

Foi realizada a extração do DNA total das cepas de *Escherichia coli* usando kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), segundo as recomendações do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e com o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente.

As ampliações por PCR foram realizadas com os *primers* SHV, TEM-1 e CTXGP1 multiplex (incluindo grupo filogenéticos 1 e 2) designados aos estudos de genes de resistência descritos por Ellington et al. (2007), para detecção dos genes *bla*SHV, *bla*TEM-1 e *bla*CTX-M. Para cada reação foram utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 3,7 mM de MgCl₂; 0,6 pmol/µL de dNTPs; 0,4 pmol/µL de cada primer; 1U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 µL com água ultra pura. Os ciclos de ampliações de cada *primer* foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) seguindo a metodologia das citações supramencionadas. Todos os reagentes utilizados foram do kit (Promega®)

Os produtos amplificados (amplicons) foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, visualizados sobre luz ultravioleta e fotodocumentados. Em seguida, os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) para identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem

foram realizadas no programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation) selecionando sequências de boa qualidade e tamanho maior ou igual a 30 pares de base. Os resultados foram comparados com sequências depositadas no banco de dados públicos (NCBI através do blast).

Análise estatística

Para realização da análise estatística os valores das variáveis NMP/g das amostras de ostras e NMP/mL de água foram transformados em Log (x+1). As médias foram submetidas à análise de variância, sendo o agrupamento de médias efetuadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Análise microbiológica da água e moluscos bivalves

A Tabela 1 mostra os valores da quantificação do grupo coliforme, bem como a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. das amostras de água e ostras do cultivo. De acordo com a análise estatística não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da densidade de coliformes a 35°C e a 45°C entre as amostras de água e ostras, quando comparadas entre as coletas e entre si, respectivamente.

Apesar de não ter diferença estatística entre a densidade de coliformes a 35°C e 45°C nas amostras, é possível observar um pequeno aumento na densidade de coliformes a 35°C, o que é justificado por conter nesse grupo diversas bactérias (entéricas e não entéricas) capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 48 horas, enquanto os coliformes a 45°C compreende um subgrupo dos coliformes a 35°C (SILVA et al., 2010).

Apesar da legislação brasileira não estabelecer valores de referência para a densidade de coliformes a 35°C em moluscos bivalves, é importante o monitoramento das áreas de cultivo, uma vez que a presença desses microrganismos reflete a qualidade higiênicosanitária do ambiente em que os organismos estão sendo cultivados (MIGNANI et al., 2013).

Durante o período de coletas as médias da temperatura, pH e salinidade da água do cultivo em Torrinhas foram de 27,5°C, pH 7,5 e salinidade 20 ppm, respectivamente. De acordo com a Resolução n° 357 (BRASIL, 2005), as águas do cultivo são classificadas em águas salobras, ou seja, salinidade superior a 0,5% e inferior a 30% e pH entre 6,5-8,0.

Não foram verificadas grandes variações quando analisados os parâmetros físico-químicos da água, visto que a baixa variação de temperatura da água nas áreas estudadas é uma característica do ambiente litorâneo baiano, por se tratar de uma área tropical. Apesar da influência de canais de rios nos estuários, a influência do mar é maior, mantendo a salinidade ao redor de 20 ppm. Em relação ao pH, o mesmo se manteve adequado, não comprometendo a atividade de filtração das ostras, uma vez que pH abaixo de 6,72 reduz a taxa de filtração e conseqüentemente a captação de alimento (PEREIRA et al., 2001).

Baseado na resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), a área de cultivo se encontra adequada para a atividade de ostreicultura, pois apresenta média geométrica de 41,80 NMP/100 mL para os coliformes a 45°C. Segundo esta resolução nas áreas de cultivo (classe 1) estas não

deverão exceder média geométrica de 43 NMP/100 mL de coliformes a 45°C de um mínimo de 15 amostras colhidas no mesmo local, devendo este monitoramento ser realizado anualmente com um mínimo de cinco amostragens.

Escherichia coli (indicador real de contaminação fecal) foi isolada em 50% das amostras de água, com ausência nas amostras de ostras, uma possível justificativa para esse resultado seria o efeito da enzima lisozima, sintetizadas nos hemócitos e presente na hemolinfa dos moluscos, que atua no rompimento da parede celular de microrganismos como um mecanismo de defesa contra a invasão de bactérias entéricas, principalmente do gênero *Escherichia* (BACHÈRE et al., 2004; BOULANGER et al., 2006) (Tabela 1). As estirpes podem ficar descaracterizadas, uma vez que há o rompimento da parede celular e com isso o extravasamento do conteúdo celular não sendo possível identificar colônias típicas da bactéria em meio de cultura, mesmo ocorrendo o crescimento de microrganismos.

A análise de moluscos bivalves apresenta melhor segurança microbiológica quando comparada com a análise da água, uma vez que nas ostras, tem-se a interação da água e o molusco por um maior período de tempo e a água representa a condição ambiental no momento da coleta (SANDE et al., 2010).

Foi verificada ausência da bactéria *Salmonella* spp. em todas as amostras de água e ostras do cultivo (Tabela 1). Este fato está de acordo com a Resolução nº 12 de 2001 que preconiza ausência de *Salmonella* em 25 g do alimento (BRASIL, 2001). Uma possível justificativa é a dificuldade desse microrganismo em competir com outras bactérias, podendo permanecer em números indetectáveis, assim como fatores ambientais (pH, temperatura e salinidade) que podem limitar o seu crescimento (SANTOS-KOELLN et al., 2009).

A Tabela 2 apresenta a análise microbiológica comparativa das amostras de ostras de cultivo e extrativismo.

Mesmo havendo diferença na densidade de coliformes a 35°C e a 45°C entre as amostras de ostras de cultivo e extrativismo, não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$), quando comparadas entre as coletas e entre si, respectivamente (Tabela 2).

A densidade de coliformes a 45°C nas ostras de extrativismo na 2ª e 3ª coletas foi maior quando comparada com a densidade microbiana das ostras provenientes do cultivo e demais coletas. A forte incidência de chuvas nesse período pode ter contribuído para o aumento da densidade microbiana de coliformes na água, uma vez que as chuvas interferem no índice de qualidade microbiológica da água por carregarem esgotos e resíduos sólidos para os cursos d'água (SANDE et al., 2010).

O estuário de Torrinhãs anteriormente localizado no município de Taperoá e próximo a um emissário da região em um estudo realizado por Santos et al. (2015) apresentou índices de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em amostras de água e ostras superiores ao encontrado nesse estudo, mostrando que a mudança do cultivo para o estuário de Torrinhãs foi satisfatório por se tratar de uma área que sofre menos influência antrópica, assegurando a comercialização de ostras com menor densidade de enterobactérias e ausência de *Salmonella* spp. o que está de acordo com a legislação (BRASIL, 2001).

A bactéria *Escherichia coli* foi isolada em 66,66% das amostras de ostras de extrativismo (Tabela 2). A presença desse microrganismo apenas nas amostras de ostras de extrativismo é justificada pelo fato da área

onde a mariscagem é realizada se encontrar próxima a centros urbanos maiores. Apesar dos dois estuários se cruzarem devido à transição de maré cheia para maré vazante, a distância entre as áreas estudadas, de aproximadamente 6 km, minimiza a influência do estuário de Taperoá com o de Torrinhãs.

A presença de bactérias entéricas e a qualidade dos corpos d'água comprometem a inocuidade dos alimentos, principalmente quando se trata de moluscos bivalves, devido à preferência de consumo “in natura”, sem que ocorra qualquer tratamento de cocção (FARIAS et al., 2010).

De acordo com o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves, Instrução Normativa Interministerial nº 7 (BRASIL, 2012) que estabelece parâmetros da densidade para as áreas de cultivo e comercialização, apenas duas amostragens apresentaram classificação II, ou seja, só deve ser destinada a comercialização após passar por um processo de depuração ou tratamento térmico (Tabela 3).

Salmonella spp. também não foi isolada nas amostras de ostras de extrativismo, estando de acordo com a legislação (BRASIL, 2001). A presença de *Salmonella* spp. em alimentos é de grande importância para a saúde pública, por se tratar de um microrganismo patogênico responsável por quadros de infecções diarreicas, febre tifóide ou até mesmo levar o paciente a óbito (DE SOUZA et al., 2010).

Apesar da concentração de *Escherichia coli* e ausência de *Samonella* spp. nas amostras de água e de ostras estar de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001; BRASIL, 2005; BRASIL, 2012), é importante o monitoramento microbiológico das áreas de pesca, principalmente quando existe extração ou cultivo de moluscos bivalves. A carência de saneamento básico ou ausência de sistema de tratamento de esgotos eficiente em alguns municípios comprometem a inocuidade dos organismos aquáticos. Nas regiões estudadas, a atividade de pesca tem grande importância para a economia local, com o trabalho efetivo de pescadores artesanais, que utilizam os recursos da pesca para o sustento de suas famílias, com a retirada de peixes e mariscos, como a lambreta, ostras, caranguejo, siri, e outros, bem como a produção em cativeiro de ostras (IBGE, 2010).

Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Foram identificadas fenotipicamente 19 cepas de *Escherichia coli*, das quais 05 foram isoladas das ostras de extrativismo e 14 isoladas da água. Desse total, 12 estirpes de *Escherichia coli* apresentaram perfil de resistência ou resistência intermediária a cinco dos antimicrobianos testados. *E. coli* provenientes da água de cultivo apresentaram apenas resistência intermediária, o que já significa que o microrganismo apresenta moderada resistência antimicrobiana (CLSI, 2010) (Tabela 4).

As cepas de *Escherichia coli* provenientes da água de cultivo do estuário de Torrinhãs apresentaram apenas perfil intermediário de resistência antimicrobiana (57,14%), enquanto os isolados das ostras de extrativismo apresentaram resistência antimicrobiana de 60% e 20% para resistência intermediária (Tabela 4).

O uso de antimicrobianos em tratamentos médicos, veterinários e agrários tem contribuído para a veiculação de bactérias resistentes e resíduos de antimicrobianos nos ambientes hídricos (CAMPOS et al., 2013).

Maior resistência foi verificada para a família dos β -lactâmicos com 71,42%, sendo que dos sete antimicrobianos testados, os isolados se mostraram resistentes a cinco, com maior resistência para a amoxicilina.

A resistência de bactérias da família Enterobacteriaceae aos antibióticos, especialmente do tipo β -lactâmicos tem sido cada vez mais frequente devido a mobilização de genes que codificam enzimas eficientes modificando sítios de ação dos fármacos. A forte pressão de seleção faz com que elementos genéticos móveis determinem em grande parte a epidemiologia da resistência aos antibióticos modernos. Desta forma, a resistência aos antibióticos está mais acessível para os microrganismos, incluindo *Escherichia coli*, que é causa importante de sepse (IREDELL et al., 2016).

A resistência observada a amoxicilina, antimicrobiano utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas é preocupante, uma vez que cepas de *Escherichia coli* resistentes podem chegar ao homem por meio da ingestão de ostras cruas, onde por conjugação podem conferir resistência a este fármaco para *Escherichia coli* comensais do trato intestinal (YANG et al., 2012).

Apesar de o Brasil buscar minimizar o uso abusivo de antimicrobianos, limitando sua utilização por meio de prescrição médica, os resíduos dessas drogas excretados em fezes e urina podem chegar aos corpos hídricos, em virtude de falhas no tratamento residual de sólidos que não são detectados pelas estações de tratamento (CAMPOS et al., 2013).

Com relação ao perfil de multirresistência, 40% das cepas de *Escherichia coli* isoladas de ostras de extrativismo apresentaram resistência a mais de um agente antimicrobiano, tendo uma delas apresentado índice MAR de 0,20, ou seja, resistência a três antimicrobianos. Não foi verificada multirresistência em *Escherichia coli* provenientes da água (Tabela 5).

Escherichia coli resistente a dois ou mais antimicrobianos pode estar associado a fenômenos de pressão seletiva que favorecem a instalação, manutenção e propagação de características de resistência entre as populações bacterianas no ambiente (BRAHMI et al., 2015). Outra característica marcante e preocupante da *Escherichia coli* é a resistência cruzada aos β -lactâmicos, a qual ocorre com maior frequência entre antimicrobianos pertencentes a uma mesma família e que age por um mesmo mecanismo de ação, o que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência, caracterizando a resistência a múltiplos fármacos (BRAHMI et al., 2015).

Quanto a origem gênica da resistência, esta foi equivalente entre plasmidial e cromossômica (50%), sendo que as cepas isoladas da água apresentaram maior percentual de resistência plasmidial (62,50%) (Tabela 5).

A presença de elementos genéticos cromossômicos apresenta transferência com uma frequência relativamente baixa e de menor impacto clínico quando comparada a resistência mediada por elementos móveis, os quais contribuem para a disseminação da resistência aos antimicrobianos entre as espécies bacterianas presentes no ambiente aquático, patogênicas ou não (ALTERTHUM; TRABULSI, 2008; BRAHMI et al., 2015).

Detecção de enzimas β -lactamases (β Ls)

A cepa de n° 9 que se mostrou resistente a ceftazidima, aztreonam e a ceftriaxona, quando submetida ao teste de disco duplo difusão, contendo uma cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona e ceftazidima) e um disco inibidor de β -lactamase (amoxicilina + ácido clavulânico) apresentou resultado negativo para a produção de enzimas, assim como na detecção de genes para produção de ESBLs (Tabela 6). A resistência a estes antimicrobianos, β -lactâmicos, pode estar associada a outros mecanismos de resistência, como impermeabilidade de membrana celular e efluxo de drogas (IREDELL et al., 2016) não verificados no presente trabalho.

A contaminação de recursos aquáticos, por meio do lançamento de esgotos domésticos, tem contribuído para a disseminação dos mecanismos de resistência. Muitos países descrevem a presença de bactérias resistentes e produtoras de ESBL em rios e efluentes, inclusive o Brasil (SILVA; LINCOPAN, 2012; SINGH et al., 2016; IREDELL et al., 2016). Relatos de ESBL em *Escherichia coli* no ambiente hospitalar têm sido frequente, especialmente envolvendo enzimas pertencentes ao grupo CTX-M-2 (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Além de todas as implicações sanitárias e de saúde pública na disseminação de microrganismos produtores de enzimas do tipo ESBL, devem-se considerar de forma particular o isolamento de bactérias resistentes oriundas da cadeia de produção animal, assim como em organismos aquáticos destinados a alimentação (LI et al., 2007; LALAK et al., 2016; SINGH et al., 2016).

No Brasil, a produção de ESBL em Enterobacteriaceae é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV e CTX-M já foram descritas como ponto de urgência clínica e estão amplamente disseminadas no território brasileiro, retratando-se diversas enzimas em diferentes patógenos (SILVA; LINCOPAN, 2012; TAYH et al., 2016).

A presença do gene *bla*TEM-1 foi observada em 83,33% dos isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados (Tabela 6). Embora esse gene seja responsável pela expressão da enzima TEM-1 de espectro restrito, mutações pontuais podem ocorrer ocasionando alterações específicas na sequência de aminoácidos e com isso resultar em uma variedade de enzimas com espectro estendido, o que se torna um problema para a saúde pública, por se tratar de enzimas que podem conferir resistência a determinados antimicrobianos, como ceftazidima e cefotaxima (NAAS et al., 2008).

O gene *bla*CTX-M foi detectado em 8,33% das cepas quando utilizado o primer que identifica enzimas do grupo filogenético 1 e 2 (Tabela 6). Dallenne et al. (2010) analisando a presença desse gene em espécies da família Enterobacteriaceae relataram a presença dos mesmos grupos filogenéticos 1 e 2, sendo que a maior prevalência de ESBLs do tipo CTX-M foi observada para o grupo filogenético 1.

O gene *bla*TEM-1, quando detectado de forma isolada, pode não estar necessariamente associado a produção de enzimas β -lactamases, porém quando existe uma associação deste gene com o *bla*CTX-M pode ser potencializada a expressão dos genes e dessa forma o microrganismo produzir enzimas β -lactamases com maior expressão (TAYH et al., 2016).

A presença de *E. coli* portadoras do gene *bla*CTX-M isoladas de amostras de fezes de bovinos, suínos e aves tem sido associado a disseminação de bactérias produtoras de enzimas β -lactamases de amplo espectro

para os seres humanos a partir de fontes de alimentos de origem animal, assim como a contaminação do ambiente aquático devido o carreamento de matéria orgânica pelas chuvas. Outra fonte de contaminação das águas tem sido a prática de adubação de hortaliças com fezes de animais próximo as comunidade ribeirinhas (HORTON et al., 2011).

Mesmo com ausência do gene *blaSHV* nos isolados do presente estudo, a sua pesquisa é importante por caracterizar resistência aos antibióticos da classe β -lactâmicos, prejudicando ou limitando dessa forma o tratamento de infecções que necessitam do uso desses fármacos (SINGH et al., 2016).

Korzeniewka et al. (2013) relataram a presença de *E. coli* em esgotos municipais de Olsztyn na Polônia e verificaram a presença do gene *blaCTX-M*, *blaSHV* e *blaTEM* localizados em plasmídeos demonstrando o risco ao ambiente aquático e a problemática que ocorre em muitos municípios que é a falta ou o tratamento inadequado de esgotos, e dessa forma as águas podem atingir os estuários e contaminá-los. Portanto, o fato de ter isolado genes responsáveis por codificar enzimas β -lactamases na região do Baixo Sul da Bahia é preocupante, mesmo com a ausência do gene *blaSHV*, pois o resultado demonstra o risco de consumo de moluscos bivalves na região, servindo de alerta para a comunidade, uma vez que esse estudo é o primeiro relato de caso realizado nessa localidade.

Brahmi et al. (2015) detectou a presença de enzimas CTX-M e TEM em *E. coli* isoladas de organismos aquáticos, sugerindo que os microrganismos isolados são provenientes de contaminação por resíduos de esgotos domésticos ou industriais, fortalecendo a hipótese de que os ambientes naturais são potentes reservatórios de bactérias multirresistentes e genes associados.

Conclusão

Apesar da quantificação de *Escherichia coli* estar de acordo com a legislação brasileira, a detecção dos genes *blaCTX-M* e *blaTEM-1* responsáveis por conferir resistência microbiana implica no risco de consumo de moluscos bivalves, devido a disseminação de resistência entre as bactérias comensais.

A multiresistência antimicrobiana verificada em bactérias isoladas de moluscos bivalves do estuário de Taperoá serve de alerta para demonstrar à comunidade o perigo que o lançamento de esgotos domésticos do município nas águas do estuário representa para a saúde pública, uma vez que os microrganismos podem colonizar o trato intestinal do homem e dificultar a terapia de infecções alimentares.

A presença de *E. coli* resistente a diferentes fármacos reforça a necessidade de saneamento básico na região, assim como a importância de consumir moluscos bivalves após passarem por processo de depuração ou tratamento térmico afim de eliminar a carga microbiana e o risco de infecções alimentares.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho e a CAPES/PNPD.

Referências Bibliográficas

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. *Microbiologia*. São Paulo. Atheneu, 2008. p. 67-84.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 198, p. 149-168, 2004.

BOULANGER, N.; BULET, P.; LOWENBERGER, C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 22, n. 6, p. 262-268, 2006.

BRAHMI, S.; DUNYACH-RÉMY, C.; TOUATI, A.; LAVIGNE, J. P. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clinical Microbiology and Infection*, Oxford, v. 21, n. 3, p. 18-20. 2015.

BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 17 mar. 2005

BRASIL. Ministério da pesca e aquicultura, Instrução normativa interministerial n. 7 de 08 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. *Diário oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 08 mar. 2012.

BUSH, K. Bench-to-review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*, Orlando, v. 14, n. 3, p. 224, 2010.

CAMPOS, C. J. A.; ACORNLEY, R.; MORGAN, O. C.; KERSHAW, S. Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999-2008. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, v.67, n. 1-2, p. 223-227, 2013.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; approved Guideline, M49-A, 26, 50. 2010.

DALLENNE, C.; COSTA, A. D.; DECRE, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Londres, v. 65, p. 490-495, 2010.

DE SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

ELLINGTON, M. J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. L. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Londres, v. 59, p. 321-2, 2007.

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, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 1, p. 1039-1042, 2011.

HORTON, R. A.; RANDALL, L. P.; SNARY, E. L.; COCKREM, H.; LOTZ, S.; WEARING, H.; DUNCAN, D.; RABIE, A.; MCLAREN, I.; WATSON, E. L. A.; RAGIONE, R. M.; COLDHAM, N. G. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 77, n. 11, p. 3715-3719, 2011.

HIRSCH, D.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEREIDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010). Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso: 10 dez. 2015.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *British Medical Journal*, Londres, v. 352, p. 6420, 2016.

KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Nova Iorque, v. 91, p. 92-106, 2013.

LALAK, A.; WASYL, D.; ZAJAC, M.; SKARZYNSKAA, M.; HOSZOWSKIA, A.; SAMCIKA, I.; WOZNIAKOWSKIB, G.; SZULOWSKIA, K. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.023>.

LI, X-Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. β -Lactam resistance and b-lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary microbiology*, Amsterdam, v. 121, p. 197-214, 2007.

MANJUSHA, S.; SARITA, G. B. Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. *International Food Research Journal*, Barking, v. 20, n. 1, p. 77-86, 2013.

MIGNANI, L.; BARBIERI, E.; MARQUES, H .L. A.; OLIVEIRA, A. J. F.C. Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 8, p. 833-840, 2013.

MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profile and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 213, n. 1, p. 7-12, 2002.

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, 2011.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, Oxford, v. 14, p. 42-52, 2008.

NASCIMENTO, V. A.; MITTARAQUIS, A. S. P.; TRAVÁLIA, B. M.; SANTOS, R. C. A.; NUNES, M. L.; AQUINO, L. C. L. Qualidade Microbiológica de moluscos bivalves - sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. *Scientia Plena*, Sergipe, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2011.

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 Hospital de Clinicas de Porto Alegre*, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

PEREIRA, O. M.; MACHADO, I. C.; HENRIQUES, M. B.; YAMANAK, N. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarina-lagunar de Cananéia-SP (25°S, 48°W). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 85-95. 2001.

PONTES, D. S.; PINHEIRO, F. A.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; GUEDES, R. L. M.; CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F. R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial Ecology*, Nova Iorque, v. 58, n. 4, p. 762-772, 2009.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, 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, 2010.

SANTOS-KOELLN, F. T. S.; MATTANA, A.; HERMES, E. Avaliação microbiológica do queijo tipo mussarela e queijo colonial comercializado na região oeste do Paraná. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Paraná, v. 3, n. 2, p. 66-74, 2009.

SANTOS, S. S.; BARRETO, L. M.; SILVEIRA, C. S.; REIS, N. A.; LIMA, K. A.; DE SOUZA, J. S.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Condições sanitárias de ostras produzidas e comercializadas em Taperoá, Bahia e o efeito da depuração na redução da carga microbiana, *Actapesca*, Sergipe, v. 3, p. 49-60, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, K. C; LINCOPAN N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

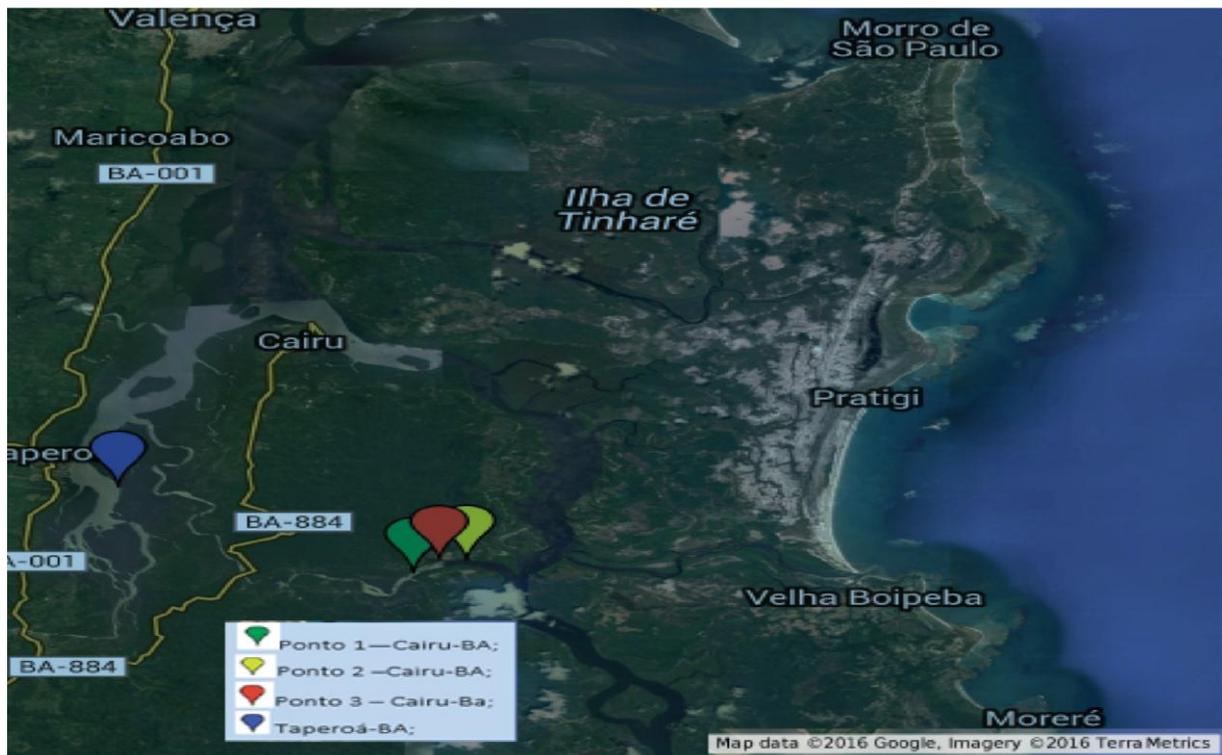
SINGH, G.; VAJPAYEE, P.; RANI, N.; AMOAH, I. D.; STENSTROM, T. A.; SHANKER, R. Exploring the potential reservoirs of non specific TEM beta lactamase (*bla*TEM) gene in the Indo-Gangetic region: A risk assessment approach to predict health hazards. *Journal of Hazardous Materials*, Amsterdam, v. 314, p. 121-128, 2016.

TAYH, G.; SALLEM, R. B.; YAHIA, H. B.; GHARSA, H.; KLIBI, N.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K. B. First report of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Gaza Strip, Palestine. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Itália, v. 6, p. 17-21, 2016.

ZHANG, Q-Q.; YING, G-G.; PAN, C-G.; LIU, Y-S.; ZHAO J-L. Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China: Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance. *Environmental Science & Technology*, Washington , v. 49, p. 6772-6782, 2015.

YANG, B.; XI, M.; CUI, S.; ZHANG, X.; SHEN, J.; SHENG, M.; QU, D.; WANG, X.; MENG, J. Mutations in gyrase and topoisomerase genes associated with fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars from retail meats. *Food Research International*, Barking, v. 45, n. 2, p. 935-939, 2012.

Figura 1. Mapa de localização dos pontos de coleta nos estuários de Taperoá e Torrinhás.



Fonte: Cardoso (2015)

Figura 2. Cultivo de ostra localizado no município de Cairu, localidade Torrinhas.



Fonte: Cardoso (2015)

Figura 3. Banco natural de ostra localizado no município de Taperoá.



Fonte: Cardoso (2015)

Tabela 1. Média do Número Mais Provável (log NMP/100 mL ou g) de coliformes a 35°C e a 45°C, presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. das amostras de água e ostras no estuário de Torrinhas, Baixo Sul, Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.

Coleta	Água			Ostras de cultivo				
	Coliformes		<i>E. coli</i>	Coliformes		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	
	35°C	45°C		35°C	45°C		Água	Ostra
1°	<2,25 aA	<2,25 Aa	-	2,65 aA	2,30 aA	-	-	-
2°	2,62 aA	2,41 aA	P	2,65 aA	<2,25 aA	-	-	-
3°	2,53 aA	2,27 aA	-	<2,25 aA	<2,25 aA	-	-	-
4°	<2,25 aA	<2,25 aA	-	2,30 aA	<2,25 aA	-	-	-
5°	2,38 aA	2,84 aA	P	<2,25 aA	<2,25 aA	-	-	-
6°	2,85 aA	2,44 aA	P	2,30 aA	<2,25 aA	-	-	-
C.V.%	0,00	7,65						

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ** “-” ausência e “P” presença. C.V (coeficiente de variação).

Tabela 2. Número Mais Provável (log NMP/100 mL) de coliformes a 35°C e a 45°C presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. das amostras de ostras no estuário do rio Una, Torrinhas, e estuário de Taperoá no rio das Almas, Baixo Sul, Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.

Coleta	Ostras cultivo				Ostras de extrativismo			
	35°C	45°C	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	35°C	45°C	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
1°	2,65 aA	2,30 aA	-	-	2,89 aA	2,30 aA	P	-
2°	2,65 aA	<2,25 aA	-	-	3,30 aA	3,15 aA	P	-
3°	<2,25 aA	<2,25 aA	-	-	3,15 aA	2,89 aA	P	-
4°	2,30 aA	<2,25 aA	-	-	2,30 aA	<2,25 aA	-	-
5°	<2,25 aA	<2,25 aA	-	-	2,30 aA	<2,25 aA	-	-
6°	2,30 aA	<2,25 aA	-	-	2,30 aA	2,30 aA	P	-
C.V.%	0,00	18,63						

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ** “-” ausência e “P” presença. C.V (coeficiente de variação).

Tabela 3. Categorias para retirada de moluscos bivalves de acordo com o Programa Nacional de Controle Higienicossanitário de Moluscos Bivalves (Brasil, 2012).

Categorias	N° de amostras (%)	
	OC	OE
I Liberada (< 230 NMP/100 g)	100 (6)	66,67 (4)
II Liberada sob condição (> 230NMP/100 g e < 46.000 NMP/100 g)	0	33,33 (2)
III Retirada suspensa (> 46.000 NMP/100 g)	0	0

OC (ostra de cultivo); OE (ostra de extrativismo).

Tabela 4. Percentual de resistência de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água e ostras nos estuários de Torrinhas e Taperoá, Baixo Sul da Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.

Antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i>					
	Ostra (5)			Água (14)		
	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos						
- Amicacina	100	0	0	100	0	0
- Gentamicina	100	0	0	100	0	0
- Estreptomicina	100	0	0	100	0	0
β-lactâmicos						
- Amoxicilina	40	20	40	71,43	28,57	0
- Aztreonam	80	0	20	100	0	0
- Cefalotina	80	0	20	71,43	28,57	0
- Ceftazidima	80	0	20	0	0	0
- Cefoxitina	100	0	0	100	0	0
- Ceftriaxona	80	0	20	0	0	0
- Imipenem	100	0	0	100	0	0
Fenóis						
Cloranfenicol	100	0	0	100	0	0
Quinolonas						
- Ác. nalidíxico	100	0	0	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0	100	0	0
Sulfonamidas						
- Sulfazotrim	100	0	0	100	0	0
Tetraciclina						
- Tetraciclina	100	0	0	100	0	0

Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R).

Tabela 5. Perfil de multirresistência e resistência plasmidial das cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água e moluscos bivalves em dois estuários do Baixo Sul, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.

Origem	Nº	Resistência anterior	MAR	Resistência plasmidial
	1	CFL	-	CFL
	2	AMO	-	AMO
	3	AMO	-	AMO

Água	4	AMO	-	AMO
	5	CFL	-	CFL
	6	AMO	-	-
	7	CFL	-	-
	8	CFL	-	-
Moluscos Bivalves	9	AZT, CRO, CAZ	0,20	-
	10	AMO, CFL	0,13	-
	11	AMO	-	-
	12	AMO	-	AMO

Nº (número de cepas), Índice MAR (Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana); AMO (Amoxicilina); CFL (Cefalotina); CAZ (Ceftazidima); CRO (Ceftriaxona), AMT (Aztreonam).

Tabela 6. Produção fenotípica de β -lactamases e detecção de genes de resistência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água e moluscos bivalves em dois estuários do Baixo Sul, Bahia, durante o período de junho de 2015 a janeiro de 2016.

Origem	Nº	Produção de β -lactamases	Genes de Resistência		
			TEM-1	CTX-M	SHV
Água	1	-	+	-	-
	2	-	+	-	-
	3	-	+	-	-
	4	-	+	-	-
	5	-	+	-	-
	6	-	+	-	-
	7	-	+	-	-
	8	-	+	-	-
Moluscos bivalves	9	-	-	-	-
	10	-	+	-	-
	11	-	+	+	-
	12	-	-	-	-

(+) positivo; (-) negativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ Faz-se necessário o monitoramento contínuo de áreas ambientais quanto a veiculação de bactérias multiresistentes, uma vez que estas podem trocar informações genéticas com a microbiota natural da água e veiculadas ao homem por meio da ingestão de moluscos bivalves.

✓ Os moluscos bivalves necessitam passar por uma etapa de depuração antes da comercialização visando minimizar o risco biológico de bactérias resistentes, uma vez que a maioria dos municípios brasileiros não dispõe de sistema de tratamento de esgotos eficiente.

✓ Espera-se demonstrar a importância da implantação de sistemas de saneamento e tratamento adequado de esgotos no município, uma vez que o descarte contínuo de resíduos de antimicrobianos em ambientes aquáticos prejudica a microbiota residente, além de causar riscos à saúde dos ribeirinhos que residem as margens dos estuários e consumidores de moluscos bivalves produzidos na região, como por exemplo, no tratamentos de infecções ineficazes.

ANEXO

➤ Normas Revista Semina: Ciências Agrárias

Diretrizes para Autores

Normas Editoriais para Publicação

ATENÇÃO AUTORES:

Recomendamos que os autores consultem atentamente as diretrizes, pois não serão aceitos trabalhos que não estejam rigorosamente de acordo com as normas.

A partir de 19/02/2015, a Taxa de Submissão de novos artigos será de 100,00. Em caso de rejeição do artigo, esta taxa não será devolvida.

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente traduzidos para o inglês.

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

American Journal Experts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

O autor principal deverá anexar no sistema o documento comprobatório dessa correção na página de submissão em “Docs. Sup.”

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação;
- b) Não tenha sido realizado o cadastro completo de todos os autores nos metadados de submissão; Exemplo: Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “Docs. Sup.” no ato da submissão;
- e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: Fonte: IBGE (2014), ou Source: IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. Material e Métodos... *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. Título do trabalho: acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹. Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.
- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

2. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

6. Numero de autores: Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO.
3. Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.

Utilize o botão "incluir autor"

1. No passo seguinte preencher os metadados em inglês.

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "editar metadados" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A identificação de autoria do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.
2. Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar “Docs. Sup.”

Declaração de Direito Autoral

Os Direitos Autorais para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude de a aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.