



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

ANTONIO PEDRO FRÓES DE FARIAS

**SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp.
ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES NO MUNICÍPIO DE
SÃO FRANCISCO DO CONDE, BAHIA**

Cruz das Almas

2013

ANTONIO PEDRO FRÓES DE FARIAS

**SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp.
ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES NO MUNICÍPIO DE
SÃO FRANCISCO DO CONDE, BAHIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Colegiado de Curso de
Bacharelado em Biologia do Centro de
Ciências Agrárias, Ambientais e
Biológicas da Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como requisito
parcial para a obtenção do Grau de
Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Suely
Evangelista Barreto

Cruz das Almas - BA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

F224

Farias, Antonio Pedro Fróes de.

Suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de moluscos bivalves no município de São Francisco do Conde, Bahia / Antonio Pedro Fróes de Farias. – Cruz das Almas, BA, 2013.

35f.; il.

Orientadora: Norma Suely Evangelista Barreto

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Antimicrobianos – *Salmonella*. 2. Molusco – Bivalve. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

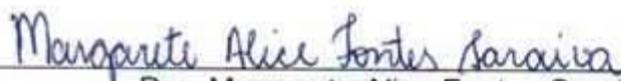
CDD: 579.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

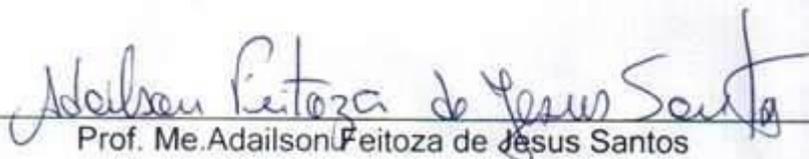
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MONOGRAFIA DE
CONCLUSÃO DE CURSO DE ANTONIO PEDRO FRÓES DE
FARIAS



Profª. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto (Orientadora)
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – UFRB



Dra. Margarete Alice Fontes Saraiva
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – UFRB



Prof. Me. Adailson Feitoza de Jesus Santos
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – UFRB

Cruz das Almas

Maio de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me foi concedido. Saúde, força, coragem e sabedoria para superar os obstáculos e realizar esta conquista. Por sua companhia constante, todas as bênçãos alcançadas e por ter colocado tantas pessoas boas em meu caminho.

A minha família, em especial aos meus pais Valdemar Barreto (Dema do Leite) e Florisbela Fróes por todo o amor, carinho, dedicação e incentivo durante esse período longe de casa, e aos meus irmãos Jorge, Renato (Bá) e Marquinhos pelo amor e companheirismo que existe entre nós, amo muito vocês.

A todos os meus tios(as), primos(as), por todo apoio e carinho, mas principalmente por tornar meus fins de semana tão especiais.

A UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, que abriu novas portas para minha formação, contribuindo com toda a estrutura física e de pessoal, em especial ao CCAAB.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, pelo auxílio nas dúvidas, e por estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial a Rebeca Rosa por ter me acompanhado durante todo esse período, dando apoio, incentivo e ajudando sempre, obrigado!!

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto por ter me acolhido, pela paciência, pelo apoio e confiança, fundamental no desenvolvimento desse trabalho. É uma honra ser o seu “Normete”.

Aos meus amigos, José Brito por ter sempre a palavra certa para o momento certo, a Bel pelo “grande” irmão que ganhei, a Luan Piritiba pela companhia, a Tércio Guedes pelas “caronas” e risadas.

Aos membros da banca, Professora Margarete e Professor Adailson por aceitarem o convite e pelas valiosas sugestões.

A todos os professores do curso de Biologia da UFRB que tornaram isso possível.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo, deixo os meus sinceros agradecimentos.

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE MOLUSCOS BIVALVES NO MUNICÍPIO DE SÃO FRANCISCO DO CONDE, BAHIA

Autor: Antonio Pedro Fróes de Farias

Orientadora: Norma Suely Evangelista Barreto

RESUMO: O uso indiscriminado de antimicrobianos tem contribuído para o aumento de bactérias resistentes, tornando difícil o tratamento das infecções. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de moluscos bivalves comercializados em São Francisco do Conde, Bahia. Ao todo foram testadas 17 cepas de *Salmonella* previamente isoladas de amostras de sururu *in natura* e processado, e ostras *in natura*. Para os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram usados os antimicrobianos ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, ceftazidima, cloranfenicol e sulfazotrim. A resistência antimicrobiana foi observada em 41,2% das cepas de *Salmonella*, e o índice de múltipla resistência antimicrobiana foi de 33,3%. Resistência à cefalotina foi observada em 29,4% das cepas, seguido de ampicilina com 17,6% e o ácido nalidíxico com 5,9%. Algumas culturas de *Salmonella* apresentaram subpopulações resistentes a cefalotina e ampicilina. Todas as cepas foram sensíveis a ceftazidima, cloranfenicol e sulfazotrim. Nenhum isolado apresentou sensibilidade após o tratamento com o agente de cura plasmidial sugerindo que o gene que confere resistência pode está presente no cromossomo. Os maiores valores da concentração inibitória mínima foram encontrados para os antimicrobianos ampicilina e cefalotina > 500 µg/mL. Esses resultados mostraram a disseminação de culturas de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos comumente usados como quimioterápicos pela população e veiculadas por moluscos bivalves.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Moluscos; Resistência; *Salmonella* spp.

ANTIMICROBIAN SUSCEPTIBILITY OF *Salmonella* spp ISOLATED FROM BIVALVE MOLLUSCS IN THE MUNICIPALITY OF SÃO FRANCISCO DO CONDE, BAHIA

Author: Antonio Pedro Fróes de Farias

Advisor: Norma Suely Evangelista Barreto

SUMMARY: The indiscriminate use of antimicrobials has contributed to the rise of antibiotic-resistant bacteria, becoming harder the treatment of infections. The objective of this work was to determine the antimicrobial resistance profile of *Salmonella* strains isolated from bivalve molluscs commercialized in São Francisco do Conde, Bahia. Seventeen *Salmonella* strains isolated from *in natura* and processed mussels and *in natura* oysters were tested. For antimicrobial susceptibility testing were used the following antimicrobials: nalidixic acid, ampicillin, cephalothin, ceftazidime, chloramphenicol and sulfazotrim. Antimicrobial resistance was observed in 41,2% of *Salmonella* strains, and the multiple antibiotic resistance index was 33.3%. Cephalothin resistance was observed in 29,4% of the strains, followed by ampicillin in 17,6% and nalidixic acid in 5,9%. Some *Salmonella* strains showed subpopulations resistant to ampicillin and cephalothin. All strains were susceptible to ceftazidime, chloramphenicol and sulfazotrim. No isolates showed sensitivity after the treatment of bacterial cell to plasmid curing agent suggesting that the resistance gene can be present in the chromosome. The highest values of the minimum inhibitory concentration were found to ampicillin and cephalothin >500 µg/mL. These results show the spread of *Salmonella* spp. resistant to antimicrobial commonly used as chemotherapeutic by population and transmitted by bivalve molluscs.

Keywords: Antimicrobials; Molluscs; Resistance; *Salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma do antibiograma realizado de acordo com as normas do CLSI (2007).....21
- Figura 2.** Fluxograma mostrando o teste de cura do plasmídeo, usando o agente mutagênico laranja de acridina.....23
- Figura 3.** Fluxograma para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nas cepas de *Salmonella* pelo método de diluição em caldo.24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de antimicrobianos utilizados na pesquisa relacionando-os às classes de antimicrobianos e seu sítio de ação17
- Tabela 2.** Antimicrobianos e seus respectivos valores dos halos de inibição propostos para as Enterobactérias (LABORCLIN, 2011)22
- Tabela 3.** Sucetibilidade antimicrobiana em culturas de *Salmonella* spp. isoladas de moluscos bivalves no município de São Francisco do Conde, Bahia.....24
- Tabela 4.** Perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e de resistência após tratamento com laranja de acridina em culturas de *Salmonella* isoladas de moluscos bivalves no Município de São Francisco do Conde, Bahia.....28
- Tabela 5.** Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das amostras bacterianas isoladas de ostra e sururu (*in natura* e processado) de São Francisco do Conde-BA30

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 11 |
| 3. OBJETIVO | 12 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 12 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 12 |
| 4. REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 4.1. Moluscos bivalves e a veiculação de doenças | 13 |
| 4.2. <i>Salmonella</i> spp..... | 14 |
| 4.3. Antimicrobianos: suscetibilidade, resistência e mecanismos de ação..... | 16 |
| 4.3.1. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos | 19 |
| 5. METODOLOGIA..... | 20 |
| 5.1. Material Biológico | 20 |
| 5.2. Determinação da suscetibilidade antimicrobiana..... | 20 |
| 5.3. Perfil de Multirresistência Antimicrobiana (MAR)..... | 22 |
| 5.4. Cura Plasmidial | 22 |
| 5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 23 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 31 |
| 8. REFERÊNCIAS | 32 |

1. INTRODUÇÃO

O uso dos corpos hídricos como recipiente para efluentes de origem orgânica aumentou consideravelmente devido ao crescimento populacional, acentuando o declínio das condições sanitárias em diversas comunidades urbanas (VASCONCELOS et al., 2010).

A contaminação dos recursos aquáticos compromete a sanidade dos organismos ali presentes. Dentre os organismos aquáticos destacam-se os moluscos bivalves que por serem filtradores, retêm compostos químicos orgânicos e inorgânicos, bem como os micro-organismos presentes na água (FARIAS et al., 2010).

Segundo Leal et al. (2008) a sanidade do ambiente no qual ocorre a produção e o extrativismo de diferentes espécies de moluscos bivalves, destinados ao consumo humano, emerge como um fator fundamental para que estes possam ser comercializados com total segurança e isentos de quaisquer micro-organismos patogênicos para o consumidor.

Muitos surtos alimentares estão associados à ingestão de ostras cultivadas ou extraídas em águas contaminadas, principalmente por patógenos de origem entérica (VIEIRA et al., 2008). A bactéria do gênero *Salmonella* é um patógeno entérico, pertencendo à família Enterobacteriaceae e classificada com base em suas características sorológicas (FIGUERÊDO, 2008). Espécies de *Salmonella* tem sido bastante relatada em surtos alimentares em vários países, sendo um dos principais agentes envolvidos em quadros de intoxicações (SHINOHARA et al., 2008), além disso, a sua presença pode ser agravada caso as estirpes apresentem resistência antimicrobiana.

O uso constante de antimicrobianos no tratamento de infecções, bem como a adição na ração animal são coadjuvantes na emergência de resistência entre cepas de *Salmonella* e outras bactérias (CARVALHO et al., 2009), contribuindo para a perpetuação de cepas resistentes e patogênicas (PINTO 2000).

A resistência antimicrobiana pode ter origem em genes cromossômicos, aquela que ocorre devido à mutação espontânea no material cromossômico, ou extracromossômicos, que ocorre devido à troca de elementos extracromossomais,

como os plasmídeos entre organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes (MOTA et al., 2005).

A presença de bactérias resistentes no ambiente pode estar relacionada ao lançamento de antimicrobianos nos corpos hídricos através de esgotos domésticos ou industriais, bem como o seu uso na aquicultura. Na água os antimicrobianos atuam como agentes seletivos aos micro-organismos mais aptos, sendo que a sua capacidade de seleção é proporcional ao tempo de exposição (CARNEIRO et al., 2007). Para Vasconcelos et al. (2010) bactérias resistentes têm tornado a terapia antimicrobiana uma missão cada vez mais difícil, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, podendo elevar a morbidade e a mortalidade de pacientes, caso sejam tratados incorretamente.

2. JUSTIFICATIVA

O despejo de resíduos (químico e biológico) nos corpos hídricos tem favorecido o aparecimento de bactérias resistentes. A ocorrência de cepas com perfil de resistência aos agentes antimicrobianos dificulta a escolha terapêutica, representando um fator agravante no controle da infecção humana e animal.

Sabendo do envolvimento da água e dos alimentos contaminados na veiculação de bactérias patogênicas e da possibilidade dessas bactérias serem resistentes, tem-se buscado estudar o perfil da resistência antimicrobiana em algumas bactérias entéricas, como por exemplo, *Salmonella*, por esta ser um importante patógeno humano.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Determinar o perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de amostras de moluscos bivalves comercializados em São Francisco do Conde, Bahia.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se as estirpes de *Salmonella* isoladas de ostras *in natura*, sururu *in natura* e processado apresentam perfil de resistência a diferentes agentes antimicrobianos comumente usados na terapia humana;
- Verificar se as estirpes apresentam perfil de multirresistência;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antimicrobiano frente aos isolados;
- Verificar se a resistência antimicrobiana é de origem plasmidial ou cromossômica.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Moluscos bivalves e a veiculação de doenças

As áreas costeiras abrigam uma grande variedade de espécies de animais que são importantes fontes de alimentos para a humanidade (LEAL et al., 2008). No entanto, a contaminação dessas áreas pode comprometer a sanidade dos organismos ali presentes, que posteriormente serão extraídos para o consumo.

A ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e o sururu (*Mytella guyanensis*) são moluscos bivalves amplamente consumidos pela população brasileira, devido principalmente ao seu elevado valor nutritivo. Estes organismos são bastante apreciados como alimento no litoral do país, como na Bahia. O consumo das ostras ocorre na maioria das vezes na forma *in natura* ou com uma leve cocção (NASCIMENTO et al., 2011; PEREIRA, 2011).

Os moluscos bivalves adaptam-se facilmente às mais diversas condições ambientais, podendo inclusive se desenvolver em águas poluídas (SANTOS, 2010). Como os moluscos possuem o mecanismo alimentar por filtração eles são bioacumuladores, refletindo diretamente as condições do ambiente em que vivem (GALVÃO et al., 2006). Dessa forma, esses organismos podem assimilar do ambiente não apenas o fitoplâncton, que compõe o seu principal alimento, mas também pesticidas, metais traços, toxinas e micro-organismos, inclusive patogênicos. Por essa razão, os bivalves, tais como ostras e mexilhões, são utilizados mundialmente como indicadores de poluição ambiental (BARROSO et al., 2001).

A ingestão de moluscos extraídos de águas contaminadas está diretamente relacionada a problemas de saúde pública, principalmente quando eles são consumidos crus ou parcialmente cozidos, e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são cultivados e capturados é comprometida (BARROS et al., 2005). Assim, o consumo de moluscos sem um processo de depuração ou tratamento térmico adequado prévio, pode ser responsável pela ocorrência de surtos de doenças alimentares (GALVÃO et al., 2006).

O consumo de moluscos bivalves proveniente da atividade de extrativismo ou de cultivo em ambientes contaminados deve ser avaliado, devido aos riscos da veiculação de micro-organismos patogênicos (BARROSO et al., 2001).

As bactérias patogênicas veiculadas pelo consumo de moluscos podem ser divididas em dois grupos: as bactérias naturais do ecossistema aquático, como *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, e as bactérias que são incluídas nesse ambiente como consequência da contaminação por dejetos orgânicos (FELDHUSEN, 2000). Os gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia* estão entre as principais bactérias transmitidas pelo consumo de moluscos contaminados por dejetos e material fecal (REIS, 2012). As culturas de *Salmonella*, são responsáveis pelos principais surtos de gastroenterites em humanos (CARVALHO et al., 2009), sendo considerada uma das principais causadoras de toxinfecções alimentares no mundo (PINTO, 2000).

No Brasil, a verdadeira incidência de doenças transmitidas por frutos do mar não é bem conhecida e a maioria dos casos não é reportada. Entretanto, existem evidências de que o pescado e seus subprodutos se encontram entre os principais alimentos associados a surtos alimentares (VIEIRA et al., 2006).

A legislação brasileira, por meio da resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, determina ausência de *Salmonella* spp. em 25 g na carne de moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados (BRASIL, 2001).

4.2. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi inicialmente caracterizado em 1885, tendo sua denominação em homenagem ao patologista Daniel Salmon. Esse micro-organismo pertence à família Enterobacteriaceae, é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato gastrointestinal dos seres humanos e de muitos animais o seu principal *habitat* (FIGUERÊDO, 2008). Essa bactéria se apresenta em forma de bastonetes curtos (1 a 2 µm) Gram-negativos, móveis (exceto os sorovares *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum), são bactérias mesófila, anaeróbia facultativa e não formadoras de esporos. *Salmonella* spp. produzem gás a partir da glicose (com exceção da *Salmonella* sorovar Typhi), utilizam o citrato como única fonte de

carbono, descarboxilam o aminoácido lisina, produzem H₂S e são indol, malonato e uréia negativas. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010; TORTORA et al., 2005).

O pH ótimo para o seu crescimento é próximo a 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Esses micro-organismos não toleram altas concentrações de NaCl, e não são boas competidoras (PINTO, 2000).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies: *Salmonella enterica*, com seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indicae*); e *Salmonella bongori*. Dentro de cada subespécie há diferentes números de sorovares, sendo atualmente conhecidos mais de 2.500. Os sorovares são caracterizados baseados na aglutinação dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os antígenos somáticos (O) são polissacarídeos ligados a um complexo lipídico (lipídio A), formando uma estrutura lipopolissacarídica presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (ARGÔLO FILHO, 2007). Os açúcares que formam a cadeia lateral deste polissacarídeo variam na sua estrutura e no número de repetições. As estruturas antigênicas conferem características imunológicas que são usadas para definir os sorogrupos e sorovares de *Salmonella* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Em geral, os antígenos flagelares (H) ocorrem em duas fases (fase um e fase dois), sendo as salmonelas que os apresentam chamadas de bifásicas. Entretanto, algumas podem apresentar uma só fase (monofásica) ou nenhuma (imóveis). Em relação ao antígeno capsular (Vi), só existe um tipo com características antigênicas, sendo encontrados somente nos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin. Dos sorovares comumente isolados, mais de 99% pertencem a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (MEDEIROS, 2006).

Todas as salmonelas são consideradas bactérias patogênicas em algum grau, causando salmonelose ou gastroenterite por *Salmonella* (TORTORA et al., 2005). A infecção por *Salmonella* pode ocorrer pelo contato direto com as fezes de animais infectados ou com água e alimentos contaminados (ARGÔLO FILHO, 2007). Alguns indivíduos infectados com *Salmonella* podem se tornar portadores assintomáticos por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de transmissão (SHINOHARA et al., 2008).

As salmoneloses têm se destacado pela sua ocorrência mundial, constituindo um importante problema sócio-econômico em vários países do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde *Salmonella* é o principal responsável por surtos de doenças transmitidas por alimentos (ALVES et al., 2001). A doença é caracterizada por febre, dor abdominal, náuseas e algumas vezes vômitos. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas, podendo durar até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* e o episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antimicrobianos (SHINOHARA et al., 2008). No entanto, em alguns pacientes (crianças, idosos, gestantes e indivíduos com sistema imunológico comprometido) a infecção pode ser mais grave e associada a desidratação pode ser fatal. Nesses casos, assim como quando *Salmonella* provoca infecção da corrente sanguínea, antimicrobianos eficazes são essenciais para o tratamento (SANTOS, 2010).

Além das implicações em saúde pública, onde a *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos responsáveis pelas doenças veiculadas por alimentos, sua presença assume uma significativa importância, diante da ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, sendo muitas vezes associadas a surtos alimentares (SANTOS, 2010).

4.3. Antimicrobianos: suscetibilidade, resistência e mecanismos de ação

Os antimicrobianos são essenciais para prevenção, controle e tratamento de infecções bacterianas em homens e animais (RIBEIRO, 2011). Eles são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Os antimicrobianos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos. Os bactericidas provocam a morte bacteriana, enquanto os bacteriostáticos inibem o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata (GUIMARÃES et al., 2010).

Os antimicrobianos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antimicrobianos em uso clínico e são classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipopepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas,

cloranfenicol, rifamicinas, etc.). Os antimicrobianos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES et al., 2010). Os antimicrobianos utilizados neste estudo, bem como os seus sítios de ação estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de antimicrobianos utilizados na pesquisa relacionando-os às classes de antimicrobianos e seu sítio de ação.

| Classe | Antimicrobiano | Sítio de Ação |
|---------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Anfenicóis | Cloranfenicol | Biossíntese de proteínas |
| β-lactâmicos | Ampicilina | Biossíntese da parede celular |
| | Cefalotina | |
| | Ceftazidima | |
| Quinolonas | Ácido nalidíxico | Biossíntese de ácidos nucleicos |
| Sulfonamidas | Sulfazotrim | Biossíntese de metabólitos essenciais |

Mesmo com o grande número de compostos disponíveis os sítios de ação dos antimicrobianos são limitados. As principais classes de antimicrobianos inibem quatro alvos principais: biossíntese da parede bacteriana, biossíntese de proteínas, biossíntese de ácidos nucleicos e metabolismo do ácido fólico. Existe um grupo capaz de afetar a membrana celular, porém estes apresentam uma alta toxicidade o que limita seu uso (CEFAR, 2006).

O grupo dos β-lactâmicos possuem em comum a presença do anel β-lactâmico em seu núcleo estrutural, o qual confere atividade bactericida. A integridade desse anel é imprescindível à sua atividade, a qual consiste em inativar um conjunto de transpeptidases que catalizam as ligações cruzadas na fase final da síntese do peptidoglicano bacteriano (LUZ, 2008).

O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro de ação e altamente efetivo. Por ser lipossolúvel, atravessa a membrana da célula das bactérias, ligando-se (de modo reversível) aos ribossomos bacterianos (especialmente à subunidade 50S), impedindo a transferência de aminoácidos, e, conseqüentemente bloqueando a biossíntese protéica pelos micro-organismos (PEZZA et al., 2006).

As quinolonas e fluoroquinolonas são fármacos bactericidas muito utilizados no tratamento de infecções do trato urinário e também no tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes aos agentes antibacterianos mais usuais. O ácido nalidíxico é ativo frente as bactérias Gram-negativas e utilizado no tratamento de infecções do trato urinário. Atuam inibindo a atividade da DNA girase ou Topoisomerase II (enzima essencial à sobrevivência bacteriana). A DNA girase torna a molécula de DNA bacteriana compacta e biologicamente ativa, e uma inibição dessa produção leva a uma síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas (GUIMARÃES et al., 2010).

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes usados no ser humano para a profilaxia e a cura de infecções bacterianas. Também conhecidas como sulfas, são antimicrobianos sintéticos caracterizados como agente bacteriostáticos, que atuam bloqueando uma etapa no metabolismo do ácido fólico (GUIMARÃES et al., 2010).

O uso constante dos antimicrobianos no tratamento de infecções e a adição na ração animal promove pressão seletiva na população bacteriana, favorecendo o aumento da ocorrência de bactérias patogênicas com perfil de resistência aos antimicrobianos (BACCARO et al., 2002; CARVALHO et al., 2009; PINTO 2000). As bactérias resistentes a antimicrobianos são encontradas em diferentes nichos ecológicos. O ambiente aquático é considerado importante para a seleção de populações bacterianas resistentes, assim como para a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis (CARNEIRO et al., 2007). A presença de antimicrobianos no ambiente aquático favorece a seleção de bactérias resistentes que podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado promovendo a transferência de genes de resistência às bactérias da microbiota natural, ou para aquelas potencialmente patogênicas aos humanos (PEREIRA, 2011).

As bactérias resistentes apresentam mecanismos que impedem a ação do composto antimicrobiano ao seu alvo específico (MOTA et al., 2005). As formas de aquisição de resistência pelas bactérias podem ocorrer por alterações no cromossomo (originando o surgimento de genes de resistência numa bactéria antes sensível), ou pela transferência de genes de resistência de uma célula para outra por meio de plasmídeos (inserção na célula receptora com DNA contendo tais genes), cuja emergência geralmente ocorre devido à seleção de um clone resistente

desta bactéria. As duas modalidades de resistência, mutação cromossômica e plasmidial, também podem estar presentes na mesma bactéria (FIGUERÊDO, 2008).

Os genes de resistência presentes nos plasmídeos podem ser facilmente trocados entre bactérias de diferentes ambientes, desta forma quando introduzidas no homem bactérias exógenas podem transferir seus genes de resistência para bactérias da microbiota natural. Este processo de transferência cruzada contribui para o aumento considerável do número de múltipla resistência bacteriana, aumentando assim o risco de transferência de plasmídeos e codificação de resistência para micro-organismos patogênicos (REBOUÇAS, 2008).

A disseminação de bactérias multirresistentes representa um importante aspecto em saúde pública, pois dificulta o tratamento de infecções em animais e humanos, principalmente crianças, idosos e imunocomprometidos (MEDEIROS, 2006).

4.3.1. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência (GUIMARÃES et al., 2010). Apesar destes mecanismos variarem entre os grupos bacterianos, a resistência aos antimicrobianos é causada por alguns fatores básicos:

a) **Inativação ou destruição do antimicrobiano:**

Enzimas catalisam a degradação do antimicrobiano ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular. As mais importantes são as β -lactamases, produzida por vários patógenos, que hidrolisam o anel β -lactâmico dos antimicrobianos (RIBEIRO, 2011).

b) **Alteração do sítio-alvo do antibiótico:**

Modificações na estrutura dos sítios onde os antimicrobianos se ligam, fazendo com que estes não possam exercer sua atividade ou um aumento da disponibilidade destes sítios dentro da bactéria, tornando as doses usuais de

antimicrobiano insuficientes para que se ligue a todos os locais disponíveis, o que permite ao micro-organismo resistir aos efeitos (REBOUÇAS, 2008).

c) Diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antibiótico:

Diminuição das concentrações do antimicrobiano no interior da bactéria, seja pela capacidade de bombear para o meio externo o agente bacteriano ou pela dificuldade do antibiótico em penetrar no interior do micro-organismo. Os micro-organismos Gram-negativos podem limitar a penetração de certos agentes, incluindo os antimicrobianos β -lactâmicos, as tetraciclinas e o cloranfenicol, pela alteração de número e estrutura das porinas presentes na membrana externa (CEFAR, 2006).

5. METODOLOGIA

5.1. Material Biológico

As 17 cepas de *Salmonella* spp. utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas de amostras de ostras *in natura* e sururu *in natura* e processado extraídos em São Francisco do Conde e que se encontram depositadas no banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA).

5.2. Determinação da suscetibilidade antimicrobiana

Para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana foi realizado o antibiograma, pelo método de difusão em ágar, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) (Figura 1).

As cepas de *Salmonella* spp. foram estriadas em placas de Petri contendo o ágar triptona de soja (TSA) (Himedia) e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, as colônias foram transferidas para tubos contendo 9 mL de solução salina (0,85%), que, após homogeneizado, foi comparado ao tubo padrão 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para essa comparação foi utilizado um espectrofotômetro,

modelo Spectrum SP-1105, no comprimento de onda de 625 nm, com limite de leitura aceitável de 0,08 a 0,10 de absorbância. Após a padronização, as culturas foram espalhadas uniformemente na superfície das placas contendo ágar Mueller-Hinton (Himedia) com auxílio de um *swab* estéril. Após a secagem das placas, os discos contendo concentrações dos antimicrobianos (Tabela 2) foram colocados na superfície do ágar com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas. Após esse período a leitura do diâmetro dos halos foi realizada com auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS).

Antibiograma

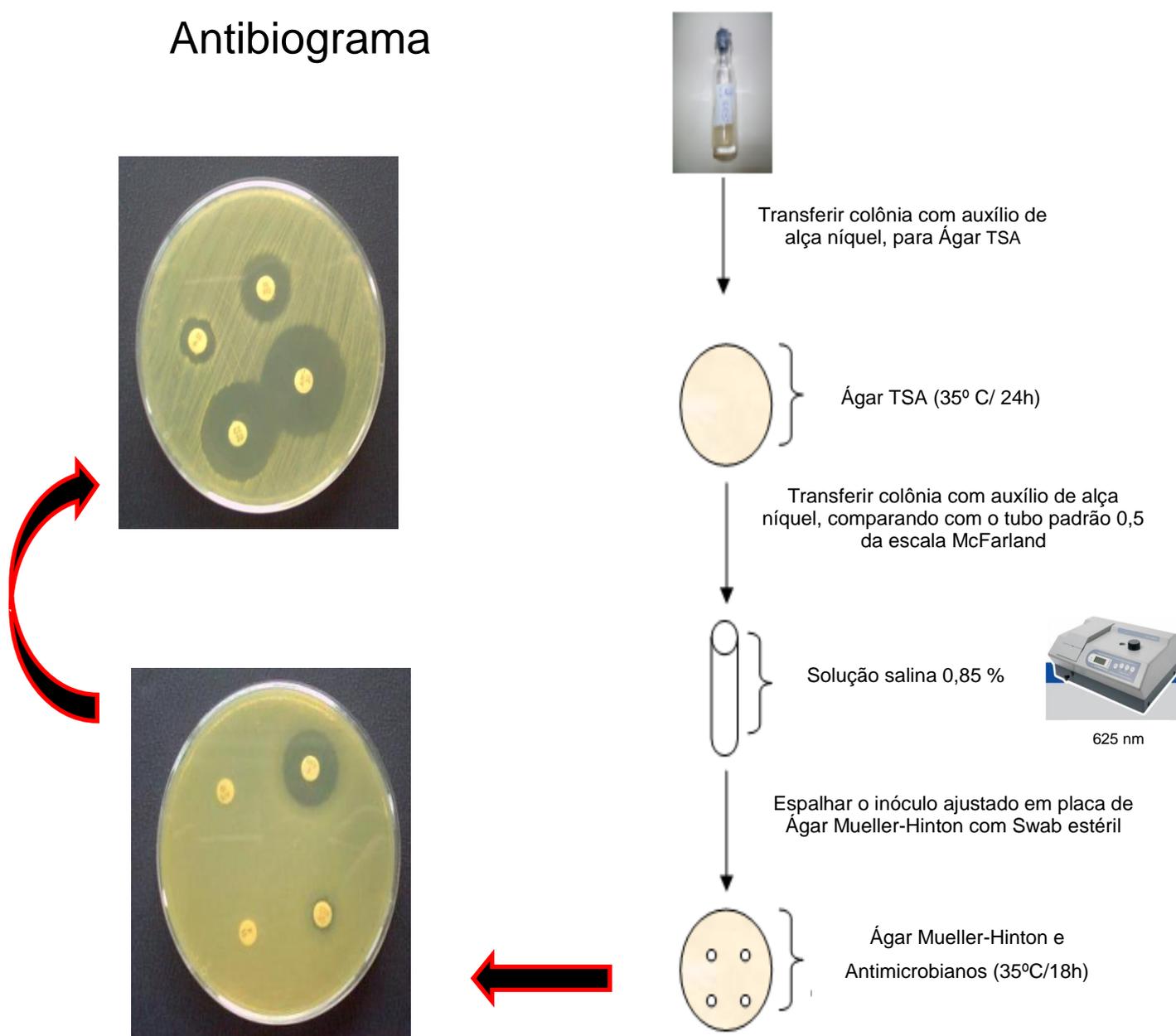


Figura 1. Fluxograma do antibiograma realizado de acordo com as normas do CLSI (2007).

Tabela 2. Antimicrobianos e seus respectivos valores dos halos de inibição propostos para as Enterobactérias (LABORCLIN, 2011)

| Antimicrobiano | Tamanho do halo de inibição (mm) | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------------|----------|
| | Resistente | Intermediário | Sensível |
| Ácido nalidíxico (10µg) | 13 | 14-18 | 19 |
| Ampicilina (10µg) | 13 | 14-16 | 17 |
| Cefalotina (30µg) | 14 | 15-17 | 18 |
| Ceftazidima (30µg) | 17 | 18-20 | 21 |
| Cloranfenicol (30µg) | 12 | 13-17 | 18 |
| Sulfazotrim (25µg) | 10 | 11-15 | 16 |

5.3. Perfil de Multirresistência Antimicrobiana (MAR)

O índice de múltipla resistência antimicrobiana (índice MAR) foi calculado a partir do número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência, dividido pelo número total de antimicrobianos testados. O valor final foi multiplicado por 100 para obtenção do resultado em percentual (HIRSCH et al., 2006).

5.4. Cura Plasmidial

As cepas que apresentaram resistência antimicrobiana foram submetidas ao tratamento com um agente de cura plasmidial a fim de verificar a perda da resistência antimicrobiana (Figura 2).

Como agente de cura foi utilizado o laranja de acridina (AO) na concentração de 100 µg/mL. As culturas foram crescidas em tubos contendo ágar triptona de soja (TSA) (Himedia) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento adicionou-se 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) suplementado com AO. Em outro tubo, acrescentou-se apenas o caldo LB (5 mL) sem AO, como controle. Em seguida, ambos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. As cepas crescidas nesses caldos foram novamente submetidas ao teste de

suscetibilidade com os antimicrobianos aos quais haviam apresentado resistência anteriormente (MOLINA-AJA et al., 2002).

Cura Plasmidial

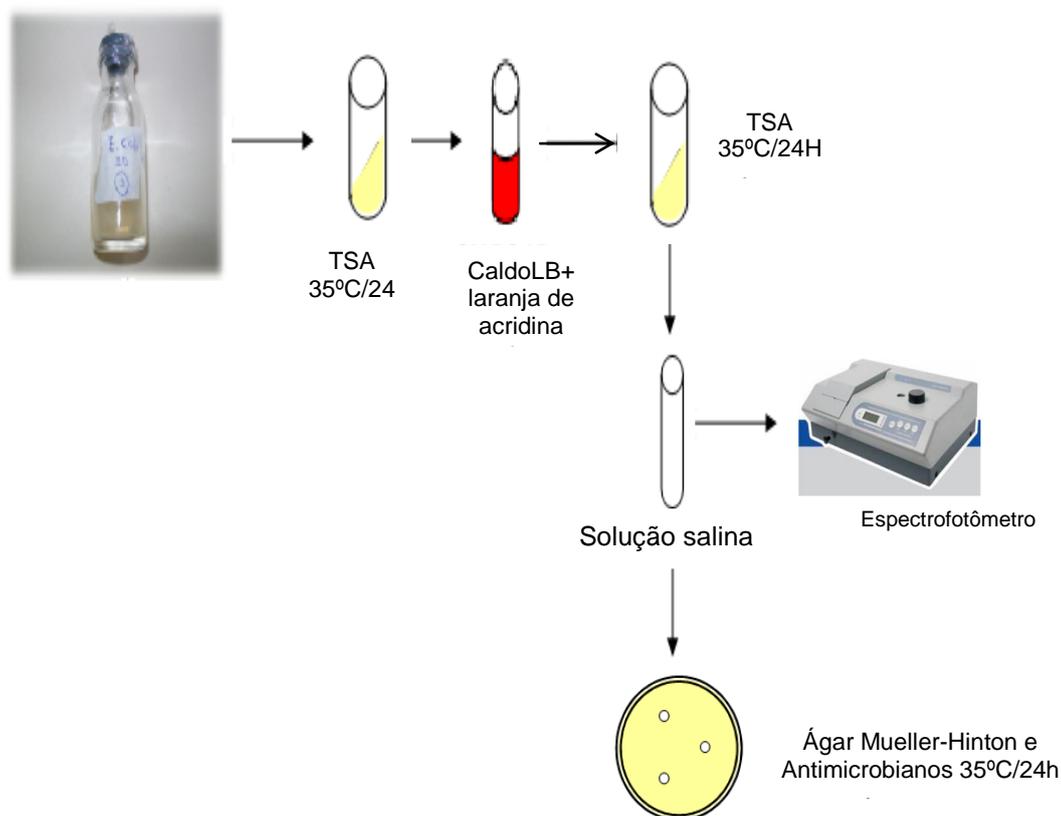


Figura 2. Fluxograma mostrando o teste de cura do plasmídeo, usando o agente mutagênico laranja de acridina.

5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizado apenas para as cepas que apresentaram resistência. Para esta análise foram preparadas soluções estoques de 100 mL dos antimicrobianos, composta por determinado antimicrobiano dissolvido em seu solvente e diluente específico como descrito no manual do CLSI (2007). Os antimicrobianos foram adquiridos comercialmente em diversas empresas farmacêuticas e hospitalares. Primeiramente, as cepas foram cultivadas em meio Agar TSA (Himedia) por 24 horas a 35°C. Após o crescimento as colônias foram transferidas para tubos contendo 9 mL de solução salina (0,85%) e padronizada, conforme citado no item 5.2. Em seguida, 1 mL da cultura padronizada foi diluída

novamente em tubo contendo 9 mL de solução salina (0,85%). Logo após, 50 μ L da diluição final foi adicionada em tubos de caldo Mueller-Hinton (Himedia) com o antimicrobiano na concentração desejada. Cada antimicrobiano foi testado em diferentes concentrações em intervalos de 10 em 10 μ g até 500 μ g, iniciando numa concentração superior à do disco utilizado no antibiograma. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, observado pela turvação do meio (Figura 3).

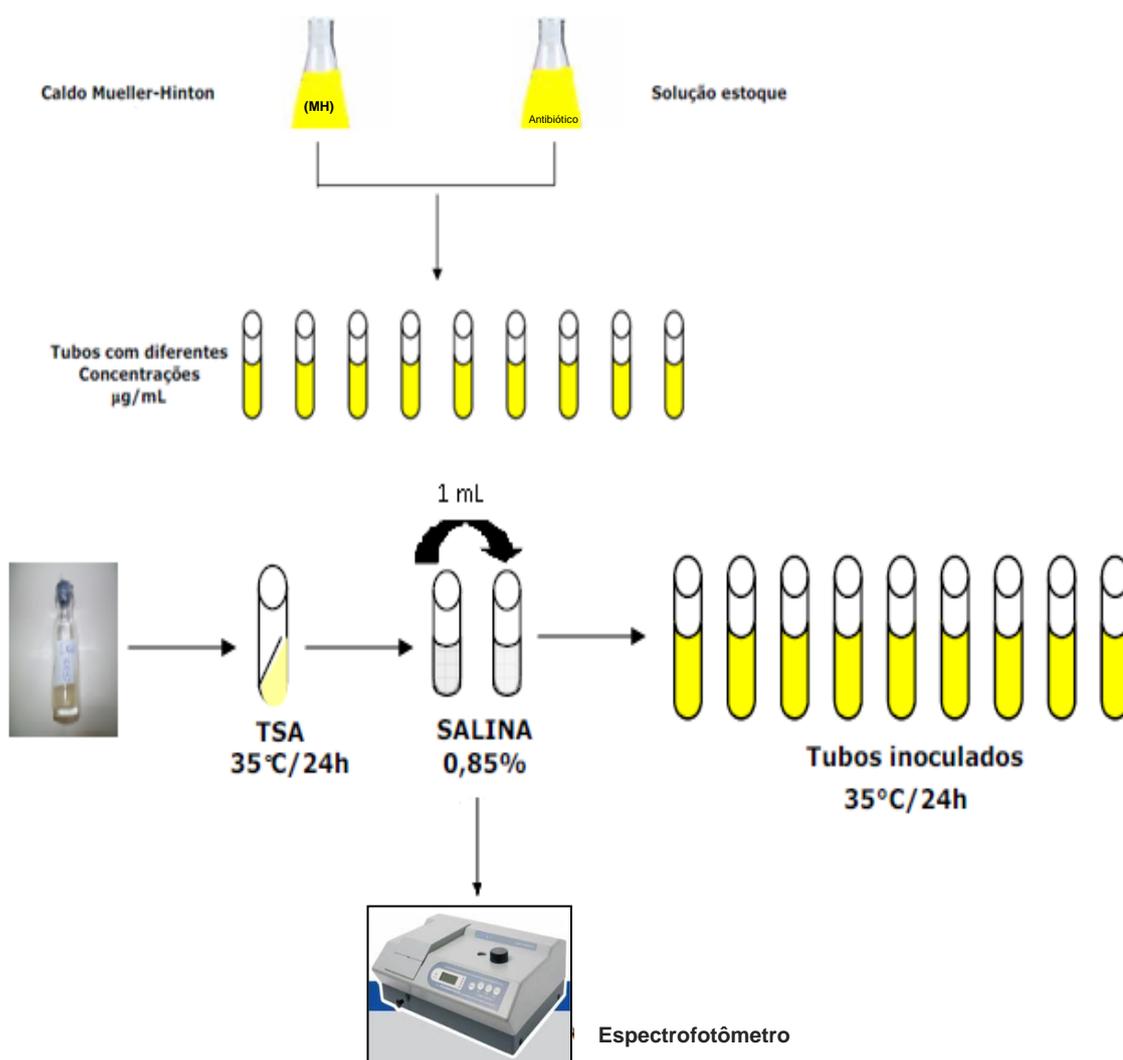


Figura 3. Fluxograma para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nas cepas de *Salmonella* pelo método de diluição em caldo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados à suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Sucetibilidade antimicrobiana em culturas de *Salmonella* spp. isoladas de moluscos bivalves no município de São Francisco do Conde, Bahia.

| <i>Salmonella</i> spp. | | Antimicrobianos | | | | | | | Resistência/Sensibilidade intermediária a um ou mais antimicrobianos | Sensível a todos os antibióticos |
|------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|----------|--|----------------------------------|
| | | Ampicilina (10µg) | Cefalotina (30µg) | Ceftazidima (30µg) | Cloranfenicol (30µg) | Sulfazotrim (10µg) | Ácido Nalidíxico (25µg) | | | |
| <i>Sururu in natura</i> | A6 su1 (1) | R | S | S | S | S | S | x | - | |
| | A6 su1 (2) | R | R | S | S | S | S | x | - | |
| | A8 su1 (1) | S* | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A8 su1 (2) | S | S* | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A8 su1 (3) | S* | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A9 su1 (1) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A9 su1 (3) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A14 su1 (2) | S | R | S | S | S | S | x | - | |
| <i>Sururu Processado</i> | Sup 3 (1) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | Sup 6 (1) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | Sup 6 (3) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | Sup 12 (1) | S* | R | S | S | S | S | x | - | |
| | Sup 12 (2) | S | R | S | S | S | S | x | - | |
| | Sup 7 (3) | S | S | S | S | S | SI | SI | - | |
| <i>Ostra in natura</i> | A6 O1 (2) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A6 O1 (3) | S | S | S | S | S | S | - | 0 | |
| | A14 O12 (3) | R | R | S | S | S | S | x | - | |
| Nº total de resistentes (%) | | 3 (17,6) | 5 (29,4) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (5,9) | 7 (41,2) | 10 (58,8) | |

R - Resistente; **S** - Sensível; **SI** - Sensibilidade Intermediária; **S*** - Sensível com subpopulações; **X** - Resistência/Sensibilidade intermediária a um ou mais Antimicrobianos; **0** - Sensibilidade a todos os Antimicrobianos.

Das 17 cepas de *Salmonella* usadas neste estudo, 07 (41,2%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo três cepas de sururu *in natura*, duas cepas de sururu processado e uma cepa de ostra *in natura*. Sensibilidade intermediária foi observada em apenas uma cepa de *Salmonella* isolada do sururu processado (Tabela 3).

Todas as cepas analisadas foram sensíveis aos antimicrobianos ceftazidima, cloranfenicol e sulfazotrim, caracterizando-se como os antimicrobianos de maior eficácia contra as culturas de *Salmonella* (Tabela 3). Resultados similares foram encontrados por Pereira (2011) estudando a qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana de *E. coli* e *Salmonella* em moluscos bivalves e carne de siri na Baía do Iguape, Maragogipe, Bahia, onde 100% dos isolados de *Salmonella* apresentaram perfis de sensibilidade aos antimicrobianos cloranfenicol, ceftazidima e sulfazotrim.

Resistência à cefalotina foi observada em 29,4% (05/17) das cepas de *Salmonella* e em 17,6% (3/17) para a ampicilina. Resistência intermediária foi observada apenas para o ácido nalidíxico em 5,9% (01/17) dos isolados (Tabela 3).

Os antimicrobianos cefalotina e ampicilina pertencem ao grupo dos β -lactâmicos. Os β -lactâmicos constituem a principal classe de antimicrobianos utilizados na prática clínica, sendo a produção de β -lactamases o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos (MENEZES et al., 2008). As β -lactamases formam um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dos antimicrobianos, inativando suas propriedades antibacterianas (LUZ, 2008).

No homem a ampicilina foi usada por um longo período no tratamento de salmoneloses graves. Entretanto, devido ao aumento dos índices de resistência e falha no tratamento terapêutico das infecções determinadas por *Salmonella*, as drogas utilizadas atualmente são cefalosporinas e fluoroquinolonas (MEDEIROS, 2006).

A presença de cepas resistentes ao ácido nalidíxico (quinolona) é preocupante, pois ela é uma das opções na clínica humana, sendo utilizada no tratamento das salmoneloses, principalmente em adultos (CARVALHO et al., 2009). O consumo de moluscos bivalves contaminados por bactérias patogênicas com perfil de resistência para estes antimicrobianos pode trazer riscos potenciais à saúde, uma vez que dificulta a escolha terapêutica, representando um fator agravante no

controle da infecção humana e animal (MEDEIROS, 2006). Nos testes com ampicilina foi observada a presença de subpopulações resistentes para os isolados A8su1(1), A8su1(3) e Sup12(1), bem como para a cefalotina, no isolado A8su1(2). As subpopulações encontradas nos halos de inibição são de bactérias mutantes, que normalmente estão presentes na população bacteriana devido a mutações espontâneas, visto que o seu aparecimento não é induzido e sim favorecido pela pressão seletiva, o que as tornam resistentes à ação do antimicrobiano (LABORCLIN, 2011; MOTA et al., 2005). As colônias das subpopulações observadas no presente estudo foram reisoladas e após novo antibiograma constatou-se que as mesmas apresentavam resistência aos respectivos antimicrobianos.

Cepas ambientais resistentes aos antimicrobianos são um fator preocupante, pois sugerem a ocorrência de despejos de efluentes sem tratamento nos ambientes aquáticos, principalmente em áreas onde são extraídos os moluscos bivalves (VASCONCELOS et al., 2010).

A grande preocupação com o crescimento da resistência antimicrobiana, principalmente em bactérias patogênicas veiculadas pelos alimentos, é a transferência de estirpes resistentes para os consumidores, podendo tornar o tratamento antimicrobiano em toxinfecções alimentares ineficaz.

Perfil de monorresistência, ou seja, resistência a apenas um antimicrobiano, foi observado em 05 (71,4%) das 07 cepas de *Salmonella* resistentes, sendo 03 (42,9%) à cefalotina, 01 (14,3%) a ampicilina e 01 (14,3%) ao ácido nalidíxico (Tabela 3).

O perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos e a resistência após tratamento com o agente indutor da cura plasmidial nos isolados de *Salmonella* estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e resistência após tratamento com laranja de acridina em culturas de *Salmonella* isoladas de moluscos bivalves no município de São Francisco do Conde, Bahia.

| <i>Salmonella</i> spp. | Antimicrobianos | MAR (%) | Cura Plasmidial |
|-------------------------|--------------------|----------|-----------------|
| Sururu <i>in natura</i> | A6 su1 (1) | AMP | - |
| | A6 su1 (2) | AMP, CFL | 33 |
| | A14 su1 (2) | CFL | - |
| | * A8 su1 (1) 2º G. | AMP | - |
| | * A8 su1 (2) 2º G. | CFL | - |
| | * A8 su1 (3) 2º G. | AMP | - |
| Sururu processado | Sup7 (3) | NAL | - |
| | Sup12 (1) | CFL | - |
| | Sup12 (2) | CFL | - |
| | * Sup12 (1) 2º G. | AMP | - |
| <i>Ostra in natura</i> | A14 O12 (3) | AMP, CFL | 33 |

AMP - Ampicilina; CFL - Cefalotina; NAL - Ácido nalidíxico; * - Subpopulação de segunda geração; AO - laranja de acridina

Multirresistência foi observada em 02 (28,6%) cepas de *Salmonella*, ou seja, índice MAR de 33,3% em ambas culturas, indicando resistência a dois dos seis antimicrobianos testados (Tabela 4). Perfil de multirresistência foi observado nas cepas isoladas de ostras e sururu *in natura* (Tabela 4). Estes resultados mostram a necessidade de realizar um monitoramento da qualidade dos alimentos consumidos sem cocção prévia, pois o uso indiscriminado de antimicrobianos contribui para a emergência de cepas de *Salmonella* multirresistentes, o que dificulta o tratamento de surtos de doenças de origem alimentar (CARVALHO et al., 2009).

De acordo com o perfil de resistência das culturas, após tratamento com o agente de cura plasmidial laranja de acridina, observou-se que nenhuma delas apresentou sensibilidade (Tabela 4), sugerindo que o perfil de resistência apresentado pelos isolados pode ser de origem cromossômica. O corante laranja de acridina é um composto catiônico que se intercala na molécula de DNA plasmidial bacteriana, interrompendo a atividade catalítica das Topoisomerases (importante no processo de replicação e superenrolamento plasmidial), inativando o plasmídeo (BARROS, 2010).

Resistência antimicrobiana cromossomal também foi descrita em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de outras fontes de contaminação (animal, ambiental,

alimentar, humana e de matéria-prima/rações) no Brasil (FIGUERÊDO, 2008; MEDEIROS, 2006). Essa forma de resistência depende da pressão seletiva realizada pelo antimicrobiano presente no seu *habitat*. A presença do agente antimicrobiano induz as células bacterianas a buscarem mecanismos de defesa para minimizar sua eficácia e assegurar a sua sobrevivência no ambiente (SANTANA, 2006). Assim, as bactérias sensíveis também podem receber genes cromossômicos de bactérias já resistentes, por meio de processos de transferências de genes, transformação, conjugação e transdução (FIGUERÊDO, 2008).

Os isolados que apresentaram subpopulações com perfis de resistência *Salmonella* A8su1(1), *Salmonella* A8su1(3), e *Salmonella* Sup12(1) de 2^o geração, e a subpopulação *Salmonella* A8su1(2) de 2^o geração, mantiveram essa característica mesmo após tratamento com o corante mutagênico. Isso pode estar relacionado ao fato dessas subpopulações também possuírem genes de resistência cromossômica, uma vez que apresentaram reincidências após o tratamento com o agente da cura (Tabela 4).

A resistência aos antimicrobianos de origem cromossômica tem sido atribuída, ao surgimento e à difusão de clones de amostras mutantes, que devido ao despejo inadequado de resíduos e esgotos, levam a contaminação dos ambientes aquáticos e dos organismos ali presentes (LIMA et al., 2006).

Os valores obtidos da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos testados (ampicilina, cefalotina e ácido nalidíxico), para os quais as cepas de *Salmonella* isoladas de moluscos bivalves, se mostraram resistentes, são apresentadas na Tabela 5. Os valores dos intervalos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) variaram de 80-90 para o ácido nalidíxico, de 190-200 a > 500 µg/mL para a cefalotina e > 500 µg/mL para as cepas resistentes a ampicilina.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das amostras bacterianas isoladas de ostras e sururu (*in natura* e processado) provenientes de São Francisco do Conde-BA.

| Amostra | Antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---------|-------|
| | AMP | CFL | NAL |
| <i>Salmonella</i> A6 su1 (1) | >500 | - | - |
| <i>Salmonella</i> A6 su1 (2) | >500 | 190-200 | - |
| <i>Salmonella</i> A14 o12 (3) | >500 | >500 | - |
| <i>Salmonella</i> A14 su1 (2) | - | 450-500 | - |
| <i>Salmonella</i> Sup 12 (1) | - | >500 | - |
| <i>Salmonella</i> Sup 12 (2) | - | >500 | - |
| <i>Salmonella</i> Sup 7 (3) | - | - | 80-90 |
| * <i>Salmonella</i> Sup 12 (1) 2º G. | >500 | - | - |
| * <i>Salmonella</i> A8 su 1 (1) 2º G. | >500 | - | - |
| * <i>Salmonella</i> A8 su 1 (2) 2º G. | - | 450-500 | - |
| * <i>Salmonella</i> A8 su 1 (3) 2º G. | >500 | - | - |

* Subpopulação; AMP - Ampicilina; CFL - Cefalotina; NAL - Ácido nalidíxico

Os maiores valores da CIM encontrados foram para os antimicrobianos ampicilina e cefalotina, acima de $500 \mu\text{g/mL}$, que foi a concentração máxima testada neste estudo. Essas concentrações são muito superiores aos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2007) para a determinação da CIM para *Salmonella* frente aos antimicrobianos: AMP, CFL e NAL $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Resultados similares foram relatados por Silva et al. (2012) estudando a resistência antimicrobiana de *E. coli* e *Salmonella* isoladas de uma área de extração de moluscos bivalves no estuário de Maragogipe, os quais encontraram CIM superiores a $500 \mu\text{g/mL}$ para a ampicilina e cefalotina em culturas de *E. coli* e *Salmonella* spp., respectivamente.

As subpopulações de *Salmonella* A8su1(1), A8su1(3) e sup12(1) de 2º geração apresentaram valor de CIM $> 500 \mu\text{g/mL}$. Já a subpopulação a8su1(2) teve seu crescimento inibido no intervalo entre $450-500 \mu\text{g/mL}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Figuerêdo (2008) onde a ampicilina mostrou-se pouco eficiente em subpopulações de *Salmonella* isoladas de dois estuários no Estado do Ceará, com valor de CIM maiores que $500 \mu\text{g/mL}$.

O resultado do CIM indica que as cepas de *Salmonella* isoladas de moluscos bivalves extraídos em São Francisco do Conde com resistência para a ampicilina apresentam um eficiente mecanismo de resistência, visto que elevadas concentrações deste antimicrobiano não foram suficientes para inibir o seu crescimento.

A emergência de subpopulações resistentes sugere que as bactérias presentes nos moluscos extraídos em São Francisco do Conde vivem em um contínuo processo de adaptação devido a pressão seletiva exercida pelo lançamento desordenado de resíduos e esgotos contendo antimicrobianos e genes de resistência na água, fato que pode acarretar sérias implicações ecológicas e de saúde pública, devido à possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos através do consumo de pescado extraídos nesse ambiente.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a ocorrência da disseminação de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de moluscos bivalves extraídas no município de São Francisco do Conde, resistentes a diversos antimicrobianos, principalmente aos antimicrobianos ampicilina e cefalotina. Fato que pode acarretar sérias implicações ecológicas e de saúde pública, devido à possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos por meio do consumo de pescado extraídos na área.

Desta forma, é necessário conscientizar a população dos riscos associados ao uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, e do lançamento de resíduos contendo antimicrobianos e quimioterápicos, que promovem pressão seletiva aos micro-organismos favorecendo a sua disseminação no ambiente aquático.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. M. C.; COSTA, N. F.; SILVA, M. S.; SALES, S. S.; CORREIA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 57-58, 2001.
- ARGÔLO FILHO, R. C. A. **Identificação, sorotipagem e diferenciação pela PCR-DGGE de sorotipos de *Salmonella* isolados de teiús criados em cativeiro.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2007.
- BACCARO, M. R.; MORENO A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 15-18, abr./jun. 2002.
- BARROS, F. W. A. **Estudo do potencial anticâncer de novos derivados acridínicos sintéticos em modelos experimentais *in vitro*.** Dissertação (Mestre em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BARROS, L. M. O.; THEOPHILO, G. N. D.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P.; VIEIRA, R. H. S. F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 3, p. 285-289, 2005.
- BARROSO, G. F. et al. Contaminação bacteriana em áreas costeiras e o cultivo de moluscos bivalves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa. **Anais eletrônicos** do 21 Congresso da ABES. Rio de Janeiro: ABES, 2001. v. 1, p. 1-9.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução RDC N^o12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF. 10 jan. 2001. Seção 1.
- CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 869-876, 2007.
- CARVALHO, F. C. T.; BARRETO, N. S. E.; REIS, C. M. F.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. S. F. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 549-556, out./dez., 2009.
- CEFAR. Resistência bacteriana. **Cefar em notícia: Informativo Cefar de Microbiologia**. Ano III, Ed. 19, jan./fev. 2006. Disponível em:

<http://www.cefar.com.br/download/jornal%2019ed_web.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2013.

CLSI: CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement**. Wayne: CLSI, PA., 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 do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 2, p.135-142, 2010.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne disease. **Microbes and Infection**, [S.l.], v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

FIGUERÊDO, F. V. **Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de dois estuários do Estado do Ceará – Brasil**. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/SP, Jaboticabal, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008.

GALVÃO, J. A.; FURLAN, É. F.; SALÁN, E. O.; PORTO, E.; M. O. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1124-1129, nov./dez. 2006.

GUIMARÃES, O. D.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antimicrobianos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Rev. Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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

LABORCLIN. **Manual para antibiograma: Difusão em disco (Kirby & Bauer)**. 5. ed. 2011. 29p.

LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Rev. Panam. Infectol.**, v. 10, n. 4, p. 48-57, abr. 2008.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICCOLI, R. H.; FILHO, J. S. S. B.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, jan./fev. 2006.

LUZ, M. A. V. R. M. R. **Isolados clínicos de Enterobacteriaceae, da comunidade, produtores de B-Lactamases de espectro alargado**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

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

MENEZES, E. A.; ALENCAR, A. M.; CUNHA, F. A.; ÂNGELO, M. R. F.; SALVIANO, M. N. C.; OLIVEIRA, I. R. N. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de suscetibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemo-culturas no berçário de um hospital de Fortaleza. **RBAC**, vol. 40, n. 1, p. 7-11, 2008.

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

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

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

PEREIRA, A. F. **Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Salmonella* em moluscos bivalves e carne de siri na Baía do Iguape, Maragogipe, Bahia**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

PEZZA, L.; RÍOS, À. NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínética micelar. **Quim. Nova**, Vol. 29, n. 5, p. 926-931, 2006.

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

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

REIS, N. A. **Contaminantes fecais em ostras em criadouro natural na região do Baixo Sul da Bahia**. 2012. 68f. Monografia (Graduação em Biologia) – Curso de

Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: Estudos in vitro e em matriz alimentícia.** Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

SANTANA, V. C. O papel dos antibióticos na resistência bacteriana. **Revista Cesumar** – Ciências Humanas e Sociais Aplicadas, v. 11, n. 1, p. 129-138, 2006.

SANTOS, J. C. **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*).** Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 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.** 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624p.

SILVA, R. A. R.; FARIAS, A. P. F.; DALTRO, T. P. P.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Salmonella* isoladas de uma área de extração de moluscos bivalves. In: REUNIÃO ANUAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E CULTURA NO RECÔNCAVO DA BAHIA, 2, 2012, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: UFRB, 2012.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimento. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

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

VASCONCELOS, F. R.; REBOUÇAS, R. H.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude de Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 405-410, jul./set. 2010.

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

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