

**ROSA HELENA REBOUÇAS**

**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 submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ROSA HELENA REBOUÇAS**

**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 submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais .

**Aprovada em 30 de março de 2008.**

---

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - Labomar

---

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira  
Universidade Federal do Ceará - Labomar

---

Profa. Dra Dália dos Prazeres Rodrigues  
Instituto Oswaldo Cruz

À minha mãe  
DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, pela oportunidade de realização do curso.

À coordenação da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo apoio financeiro a pesquisa através da concessão de bolsa de estudo.

À Professora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira por permitir a realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

À Oscarina Viana de Sousa pela orientação e paciência ao longo deste trabalho.

Aos colegas de curso que pelas trajetórias de mestrado acabaram se distanciando, deixando lembranças dos momentos de alegria.

Aos colegas de laboratório: Anahy, Buda, Camila, Carlos, Cristiane, Darlyane, Francileide, Giuseppe, Gleire e Norma pelos diversos momentos de descontração, agonias, raivas e alegrias durante todo o período da realização deste projeto.

Às amigas Cláudia e Danny pela preciosa colaboração no projeto inicial do mestrado, pelo incentivo, companheirismo em todos os “pilotos” da água de coco, muito obrigada.

Ao Fábio pela valiosa colaboração na execução desse trabalho, obrigada pela ajuda com as análises, atenção, solidariedade, conversas e principalmente amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos.

## **O SEGREDO DA BUSCA...**

O segredo da Busca é que não se acha.

Eternos mundos infinitamente,

Uns dentro de outros, sem cessar decorrem

Inúteis; Sóis, Deuses, Deus dos Deuses

Neles intercalados e perdidos

Nem a nós encontramos no infinito.

Tudo é sempre diverso, e sempre adiante

De (Deus) e Deuses; essa, a luz incerta

Da suprema verdade.

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

O cultivo de camarão marinho é uma atividade do agronegócio de grande importância econômica para o Brasil, principalmente, para os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará que se destacam pela sua produção. Nos últimos anos o surgimento de doenças e infecções contribuíram para uma queda nos índices de desenvolvimento da carcinicultura. O uso desordenado de antibióticos como medida preventiva e no tratamento das enfermidades dos camarões implicou no surgimento de estirpes bacterianas mais resistentes aos medicamentos, podendo provocar danos à saúde humana e comprometer a exportação. Esta pesquisa objetivou avaliar o perfil fenotípico de resistência das espécies de *Vibrio* isoladas da água de viveiro e hepatopâncreas de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em três fazendas do Estado do Ceará. Dentre o total de 31 isolados de *Vibrio* analisados foi observada uma maior incidência de resistência aos antibióticos: ampicilina (46,15% e 44,44%), cefoxitina (7,69% e 27,78%) e ao grupo das tetraciclina (53,84% e 38,89%) para as amostras oriundas de água de viveiro (N=13) e de camarão (N=18) respectivamente. A maioria (80,64%) das estirpes de *Vibrio* sp. isoladas apresentou resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, alguns dos quais são drogas utilizadas na clínica humana. Um percentual significativo (44%) dentro das cepas resistentes apresentou perfil de multi-resistência. Foram observados 7 perfis de resistência múltipla, onde 5 cepas foram resistentes a 2 antibióticos, 4 resistentes a 3 antibióticos e 2 cepas resistentes a 4 antibióticos. A relação entre a presença de plasmídios e a resistência aos antibióticos foi verificada para 81,8% dos isolados multi-resistentes. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida para os isolados que se apresentaram resistentes à oxitetraciclina, indicando valores máximo de 697mg/L e mínimo de 79mg/L. O comportamento qualitativo de resistência aos antimicrobianos não foi influenciado pela origem dos isolados quanto ao tipo de amostra e estuário de origem. A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados em clínica humana é um fato preocupante, uma vez que dificultam o tratamento de infecções dentro do cultivo, podendo trazer danos à saúde humana.

**Palavras-chave:** *Vibrio*, plasmídios, multi-resistência, antibiótico.

## ABSTRACT

Marine shrimp culture is an agribusiness activity with great economic importance to Brazil, especially to the states of Rio Grande do Norte and Ceará that have an outstanding production. Over the last years, arising diseases and infections contributed to the decline in carciniculture development. The unsustainable use of antibiotics as preventive measures and in the treatment of shrimp illness initiated an outbreak in drug-resistant bacterial strains that can cause damage to human health and therefore jeopardize exportation. This research aimed to evaluate the phenotypic resistant profile of the species *Vibrio*, isolated from samples of culture pond water and cultured marine shrimp hepatopancreas (*Litopenaeus vannamei*) in three shrimp farms in the state of Ceará, Brazil. Amongst the total of 31 *Vibrio* isolates, it was analyzed the resistance to ampicillin (46.15% and 44.44%), cefoxitin (7.69% and 27.78%) and to the tetracycline group (53.84% and 38.89%) in samples collected in culture pond water (N=13) and shrimp (N=18), respectively. The majority (80.64%) of isolated *Vibrio* sp. strains presented resistance to at least one tested antimicrobial drug, some been commonly used in human clinics. A significant percentage (44%) of resistant strains presented a multiresistant profile. Seven multiresistant profiles were identified in 32.26% of strains, where 5 strains were resistant to 2 antibiotics, 4 were resistant to 3 antibiotics and 2 were resistant to 4 antibiotics. A correlation amongst the presence of plasmid and antibiotic resistance was present in 81.8% of the multiresistant isolates. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was calculated for the isolates that presented resistance to oxytetracycline, indicating maximum values of 697 mg/L and minimum of 79 mg/L. The qualitative behavior of antimicrobial resistance was not influenced by the origin of the isolates as for the type of sample or the estuary origin. The presence of antimicrobial resistant bacteria, commonly used in human clinics, is a concerning factor once it tends to hamper infection treatment in shrimp cultures, possibly causing damage to human health.

**Key-words:** *Vibrio*, plasmids, multiresistance, antibiotic.



**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1:** Evolução da produção do camarão cultivado do Brasil.....2
- FIGURA 2:** Dendrograma da divisão dos *Vibrios* em quatro famílias baseada no 16S rRNA.....7
- FIGURA 3:** Representação dos três mecanismos comuns de resistência a antibióticos.....25
- FIGURA 4:** Representação esquemática das inter-relações de microrganismos e sua movimentação através dos quatro principais ecossistemas. O movimento ecológico dos microrganismos entre solo, água, humanos e animais paralelo à evolução e espalhamento de genes de resistência.....27
- FIGURA 5:** a) Representação esquemática do método *E-test*. b) Sistema Vitek (bioMérieux Vitek), agrupa inoculador e incubador em um mesmo módulo; c) Representação do antibiograma pelo método do disco-difusão; d) Representação do método da diluição em caldo (CIM).....29
- FIGURA 6:** Mapa com a localização dos pontos de coleta.....30
- FIGURA 7:** Fluxograma da verificação da pureza das cepas.....33
- FIGURA 8:** Fluxograma do teste de antibiograma, a partir de cepas de *Vibrio* isoladas de água de cultivo e camarão.....35
- FIGURA 9:** Fluxograma do procedimento de cura plasmidial, a partir de cepas de *Vibrio* isoladas de água de cultivo e camarão.....38
- FIGURA 10:** Gráfico do perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Vibrio* isoladas da água dos viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no Estado do Ceará.....41
- FIGURA 11:** Gráfico do perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Vibrio* isoladas do hepatopâncreas de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Estado do Ceará.....44
- FIGURA 12:** Dendrograma de similaridade fenotípica baseado nos perfis de resistência aos antimicrobianos.....54

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b> Características das espécies de <i>Vibrio</i> não coléricos clinicamente importantes.....	18
<b>TABELA 2:</b> Relação do local de origem e identificação dos isolados.....	31
<b>TABELA 3:</b> Lista dos antibióticos utilizados na pesquisa relacionando-os às classes de antimicrobianos e seu sítio de ação.....	36
<b>TABELA 4:</b> Tabela com os valores dos intervalos dos halos de inibição.....	36
<b>TABELA 5:</b> Percentual de sensibilidade e resistência entre as cepas de <i>Vibrio sp.</i> (N=13) isoladas de água de viveiros de cultivo de camarão ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) cultivados.....	40
<b>TABELA 6:</b> Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de <i>Vibrio</i> isoladas de amostras de água de viveiro dos cultivos de camarão.....	43
<b>TABELA 7:</b> Percentual de sensibilidade e resistência entre as cepas de <i>Vibrio sp.</i> (N=18) isoladas do hepatopâncreas de camarões ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) cultivados.....	44
<b>TABELA 8:</b> Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de <i>Vibrio</i> isoladas de amostras hepatopâncreas de camarão cultivado <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	46
<b>TABELA 9:</b> Perfil de multi-resistência das cepas de <i>Vibrio</i> isoladas de água de viveiro e hepatopâncreas de camarão cultivado.....	48
<b>TABELA 10:</b> Resultado do tratamento da cura de plasmídeo.....	50
<b>TABELA 11:</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxitetraciclina para as cepas de <i>Vibrio</i> isoladas a partir de amostras de água de viveiro e hepatopâncreas de camarão cultivado ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	53

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AC – antes de Cristo

Ab – antibiótico

AMP – Ampicilina

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO – acridine orange

ATCC – American Type Culture Collection

ATM – Aztreonam

AV – água de viveiro

AVIB – Association of Vibrio Biologists

BHI – Brain Heart Infusion

Ca – cálcio

CIM – concentração inibitória mínima

DNA – ácido desoxirribonucléico

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FLF – Florfenicol

FOX – Cefoxitina

GEN – Gentamicina

h – horas

ha – hectares

H<sub>2</sub>S – gás sulfídrico

HP – hepatopâncreas

IPM – Imipenem

Km – quilômetro

L - litro

LB – caldo Luria Bertani

MH – ágar Mueller Hinton

mm – milímetro

m<sup>2</sup> – méτρο quadrado

NaCl – cloreto de sódio

Mg – magnésio

mg – miligrama

NCCLS – National Commitee for Clinical Laboratory Standards

N – negativo

N<sub>2</sub> – nitrogênio

NAL – Ácido nalidíxico

NHP – Hepatopancreatite Necrosante

NIT – Nitrofurantoína

NO<sub>2</sub> – óxido nítrico

NO<sub>3</sub> – nitrato

OIE – World Organization for Animal Health

OMS – Organização Mundial da Saúde

Opas – Organização Panamericana da Saúde

OTC – Oxitetraciclina

P – positivo

R – resistente

RNA – ácido ribonucléico

S – sensível

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

SXT – Sulfametoxazol-trimetropim

t – tonelada

TCBS – Tiosulfato-citrato-bili sacarose

TET – Tetraciclina

TSA – ágar tripitona soja

TSB – caldo soja triptona

UFC – Universidade Federal do Ceará

WHO – World Health Organization

µg – micrograma

µm – micrômetro

**ÍNDICE**

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 O cultivo de camarão no Brasil.....	1
1.1.2 O uso de antibióticos na aquicultura.....	3
1.2 Objetivos.....	5
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Vibrionaceae.....	6
2.2 Patogenicidade.....	9
2.2.1 Espécies de <i>Vibrio</i> patógenas para humanos e animais.....	10
<b>3. ANTIBIÓTICOS: BREVE REVISÃO.....</b>	<b>20</b>
3.1 Mecanismos de ação dos antibióticos.....	20
3.2 Mecanismos de resistência.....	23
3.3 Plasmídios de resistência.....	26
3.4 Técnicas de avaliação da resistência bacteriana.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Origem das cepas.....	30
4.1.2 Verificação da pureza das cepas.....	32
4.1.3 Morfologia das colônias (crescimento sobre o meio Agar TCBS).....	32
4.1.4 Análise morfotintorial das células (técnica de Gram).....	32
4.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	34
4.2.1 Teste de difusão em disco.....	34
4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37
4.4 Cura de plasmídios.....	37
4.5 Similaridade dos isolados baseado no perfil de resistência aos antibióticos.....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *VIBRIO* ISOLADO DE ÁGUA DE VIVEIRO E DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) CULTIVADO EM FAZENDAS NO ESTADO DO CEARÁ

Rosa Helena Rebouças

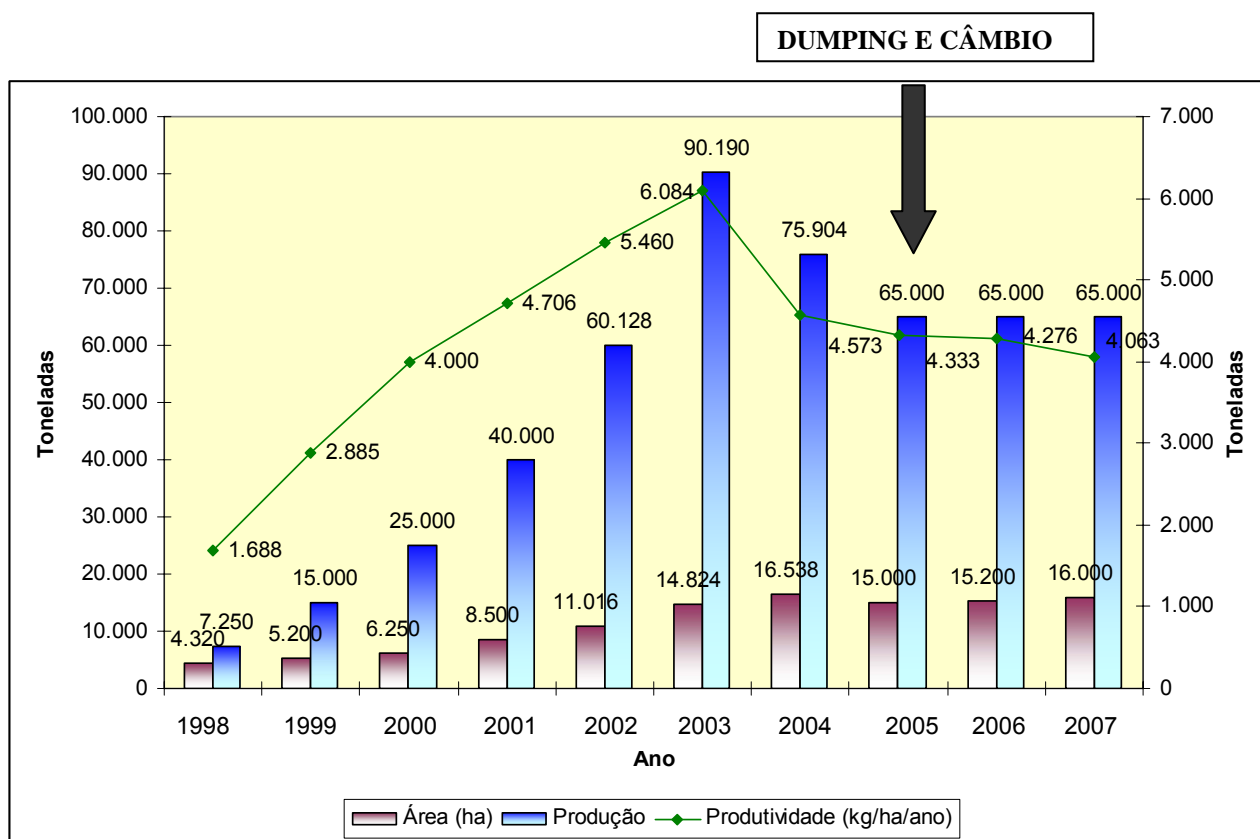
### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Cultivo de camarão no Brasil

O potencial aquícola do Brasil está representado pelos recursos dulcícolas, uma vez que, possui 12% da reserva de água doce do mundo e já conta com 5 milhões de hectares de águas represadas e marinhas, representadas por um potencial superior a 600.000 hectares de terras planas e 8.500 Km da costa (MAIA, 2005).

A carcinicultura brasileira, que em realidade, teve origem no início da década de 70, somente a partir da década de 80, com a introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, ganhou caráter empresarial. Até o ano de 1994, quando a produção do setor foi de apenas 1.996 toneladas (t), essa atividade era praticada por pouco mais de 20 empresas, todas operando de forma semi-intensiva (5 – 10 camarões / m<sup>2</sup>). A partir de 1995, teve início uma nova fase para a carcinicultura brasileira, motivada pela participação e consolidação do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*). Sendo oriundo do Oceano Pacífico, esse crustáceo, embora tenha sido introduzido no Brasil em meados da década de 80 somente a partir de 1994/95 começou a ser produzido comercialmente para os produtores. A atividade, então, tomou um novo impulso, passando a crescer a taxas superiores a 60% ao ano, até 2003, quando a produção atingiu a marca de 90.190 t, com exportações de 58.455 t e US\$ 226.0 milhões (PAIVA ROCHA; MAIA ROCHA, 2007).

Uma demonstração da evolução da produção brasileira de camarão desde o ano de 1998 até 2007 está apresentada na Figura 1, indicando o período crítico em que houve uma queda significativa da produção e produtividade gerada pela ação do “*dumping*” e pela desvalorização do dólar americano, o que afetou as exportações do produto brasileiro.



**FIGURA 1** – Evolução da produção do camarão cultivado do Brasil (ROCHA, 2007).

O camarão de cultivo responde por cerca de dois terços da produção total de camarões no Brasil, com destaque para os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. No mundo, o camarão de cultivo representa um pouco mais da metade da oferta total (CARVALHO et al., 2007).

A cultura de camarão sofre problemas relacionados com questões ambientais, devido ao seu rápido desenvolvimento e altas taxas de estocagem, resultando no surgimento de estresse nos animais e subseqüentemente a incidência de doenças. Muitas fazendas de camarão foram afetadas por epidemias de vírus e vibrioses (CHIU et al., 2007).

De acordo com Nunes e colaboradores (2005), o cultivo de camarão marinho em cativeiro é uma das atividades do agronegócio brasileiro mais representativo na Região Nordeste. Desde o início desta década que o setor cresce de forma acelerada, em particular no Estado do Ceará, um dos maiores produtores nacionais.

O Brasil, dentre outros países produtores de camarão marinho em cativeiro, tem enfrentado, nos últimos anos, vários impactos causados por enfermidades que contribuíram para a queda dos índices de desenvolvimento da carcinicultura (ALVES; MELLO, 2007).

O principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura em nível mundial consiste atualmente no controle das infecções. As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nos cultivos, propiciam o rápido alastramento dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades maciças e levando, por conseqüência, a prejuízos econômicos incalculáveis (BARRACO, 2004).

### 1.1.2 O uso de antibióticos na aqüicultura

Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho de camarões ou populações de camarões cultivados. No cultivo, as enfermidades são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões cultivados e os agentes potencialmente patogênicos (NUNES; MARTINS, 2002).

No passado, a piscicultura e a carcinicultura no Brasil eram praticadas em sistema extensivo, com baixas densidades, o que favorecia a resistência nos animais frente às doenças. Com a expansão e a consolidação da tecnologia, aumentaram o número de fazendas e a intensificação dos sistemas de produção o que favorece a disseminação de doenças, como já ocorre (ZANOLO, 2006).

A aplicação de antibióticos nos viveiros de cultivo não é apenas cara, mas também prejudicial agindo, por exemplo, na seleção de bactérias que são resistentes às drogas ou estirpes mais virulentas e levando resíduos dessas drogas aos animais de cultivo prontos para consumo (DECAMP; MORIARTY, 2005).

Na piscicultura os antibióticos mais recomendados são a tetraciclina, eritromicina e oxitetraciclina, sendo esta última ministrada na ração para tratamento de furunculose e da eritrodermatite da carpa. Em camarões, a oxitetraciclina é usada como medida profilática contra o agente da Hepatopancreatite Necrosante (NHP), bem como nas doenças determinadas por bactérias piscicrófilas e na septicemia hemorrágica por *Pseudomas*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* (MAPA, 1999).

Com o decorrer dos tempos foram evidenciados efeitos maléficos desse procedimento, que provoca o surgimento de bactérias resistentes, causando danos à saúde humana, além de comprometer a qualidade do produto para exportação. Os Estados Unidos e a União Européia, principais mercados importadores do camarão brasileiro, divulgaram uma lista de produtos terapêuticos cuja aplicação é proibida. Os nitrofuranos e os cloranfenicóis têm sua administração proibida. Apenas três



antibióticos têm sua aplicação permitida nos organismos cultivados: oxitetraciclina-HCL, sulfamerezin e romet<sup>®</sup>30. Dos três, a oxitetraciclina (OTC) é empregada na carcinicultura no combate do NHP (NUNES et al., 2005).

De acordo com Zanolo (2006), no Brasil não existem antibióticos registrados para uso na aquicultura, portanto os usados atualmente na atividade não são específicos para tais fins, pois não apresentam respaldo pelos fabricantes no que diz respeito às informações essenciais para o uso eficaz e responsável do medicamento (dose, período de carência, informações ambientais, modo de administração, etc).

O uso de vários antimicrobianos é permitido na produção de peixe e camarão, em vários países, particularmente na Ásia. Lamentavelmente, poucas informações estão disponíveis sobre o tipo de antimicrobiano usado na aquicultura. Estas informações se fazem necessárias para avaliar o padrão atual de uso dessas substâncias, identificando perigos na segurança alimentar e no controle de doenças infecciosas em humanos (WHO, 2002). Em uma pesquisa realizada por Holmstrom et al. (2003), na região costeira tailandesa (principal produtor mundial de camarão cultivado) foram identificados pelo menos 7 diferentes grupos de substâncias antibióticas sendo utilizadas pelos produtores de camarão. Entre estas, o cloranfenicol.

Atualmente existem diversas classes de antibióticos, o que frequentemente nos possibilita tratar o mesmo agente infeccioso com vários esquemas terapêuticos (EL-FAR; RICHTMANN, 2001). Os mesmos também são utilizados para vibrioses em cultivo de camarão com sucesso variado por causa do rápido desenvolvimento da resistência (FRELIER, et al. 2004).

O controle da dinâmica populacional das bactérias no camarão e no viveiro é um importante indicador do início de um processo infeccioso no cultivo, sendo importante frisar que a maior parte das bactérias, assim como os víbrios, faz parte da microbiota natural do ecossistema estuarino, onde geralmente são instaladas as fazendas de cultivo de camarão (NUNES; MARTINS, 2002).

Tendo em vista a relevância de espécies do gênero *Vibrio* para a atividade de aquicultura e os danos que a utilização inadequada de substâncias antimicrobianas pode vir a trazer para essa atividade, desenvolvemos esta pesquisa avaliando a resposta de isolados ambientais do gênero *Vibrio* frente a diferentes antimicrobianos entre os quais alguns utilizados na terapêutica humana.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o comportamento de estirpes de *Vibrio* isoladas da água dos viveiros e hepatopâncreas de camarões cultivados (*Litopenaeus vanammei*) frente a diferentes classes de antimicrobianos.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Realizar teste de antibiograma pela técnica de disco-difusão com as cepas de *Vibrio* isoladas e identificadas;
- Verificar a ocorrência de multi-resistência entre os isolados;
- Estabelecer a origem genética (plasmidial ou cromossômica) das resistências apresentadas pelas estirpes multi-resistentes através do processo de cura dos plasmídios;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o antibiótico oxitetraciclina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vibrionaceae

O nome Vibrionaceae foi originalmente proposto por Veron, em 1965, com a intenção de agrupar numerosos bacilos gram-negativos não entéricos, fermentadores, oxidase-positivos e que se movimentam por meio de flagelos polares. Esse agrupamento foi considerado conveniente para diferenciar tais microrganismos das Enterobacteriaceae e não envolvia uma relação taxonômica entre as espécies que incluía (KONEMAN et al., 2001).

Segundo definição feita por Baumann et al. (1984), a família Vibrionaceae inclui os seguintes gêneros: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Esses microrganismos foram classificados juntos não só por serem encontrados principalmente na água, mas também por serem capazes de causar doença gastrointestinal. Entretanto, as técnicas biomoleculares estabeleceram que esses gêneros possuem apenas uma relação distante e pertencem a famílias distintas: *Vibrio* e *Aeromonas* são classificadas na família Vibrionaceae e *Aeromonadaceae*, respectivamente, e as *Plesiomonas* devido sua íntima relação com os *Proteus* foram colocadas na família das Enterobacteriaceae (MURRAY et al., 2004).

De acordo com informações divulgadas pela *Association of Vibrio Biologists* (AVIB, 2007) métodos para identificação de grupos ou espécie-específicos recentemente desenvolvidos estão proporcionando novas descobertas sobre a ecologia das Vibrionaceae em que o número de membros ainda está sendo expandido. Atualmente, o número de espécies aceitas para o gênero *Vibrio* é de 90, distribuídas em cinco famílias: *Enterovibrio* (2 espécies), *Grimontia* (1 espécie), *Photobacterium* (15 espécies com 2 subespécies), *Salinivibrio* (1 espécie com 3 subespécies) e *Vibrio* (71 espécies) (Figura 2).

Os membros do gênero *Vibrio* são habitantes da flora normal aquática, se apresentam como bactérias curtas, curvadas e em forma de bastão. Os vibriões têm relacionamento próximo com as Enterobacteriaceae e apresentam movimento rápido devido a um único flagelo polar. Todas as espécies de *Vibrio* são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas com elevada salinidade e temperatura variando de 10 a 30°C (MANJUSHA et al., 2005; STROHL et al., 2004; MURRAY et al., 2004).

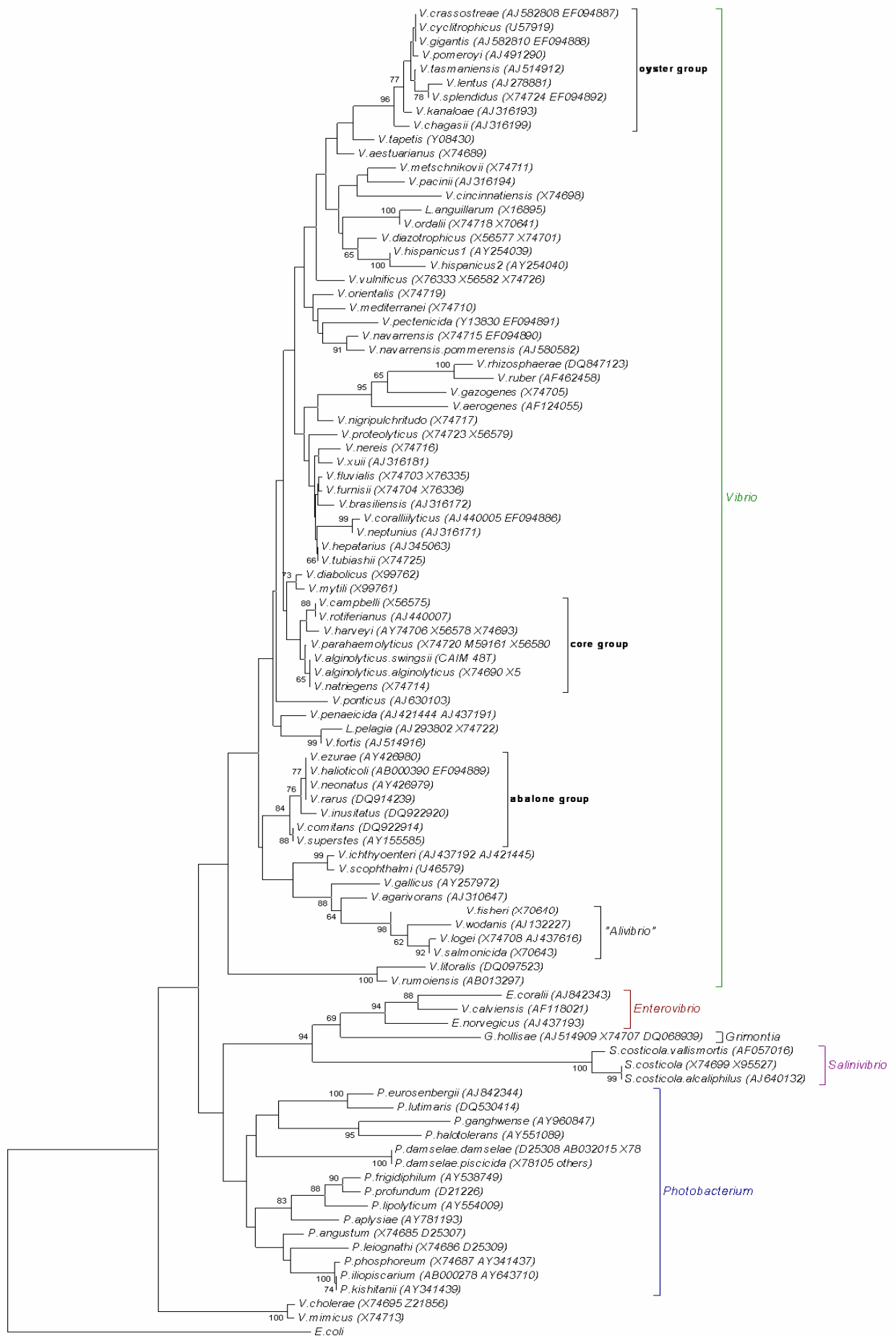


FIGURA 2 – Dendrograma da divisão dos *Vibrios* em quatro famílias baseada no 16S rRNA (AVIB, 2007).

Os vibriões crescem com facilidade nos meios de isolamento; o desenvolvimento e a reatividade bioquímica de todas as espécies é favorecido pela adição de 1 a 2% de NaCl ao meio. As colônias são tipicamente lisas, convexas, de consistência cremosa, branco-acinzentadas, com bordas contínuas. Em certas ocasiões, são observadas colônias rugosas, aderentes ao ágar. Certos vibriões marinhos podem invadir a superfície do meio sólido, propriedade associada à presença de células longas com flagelos laterais. Os *Vibrios* são anaeróbios facultativos capazes de realizar metabolismo tanto oxidativo quanto fermentativo, são produtoras de citocromo oxidase (KONEMAN et al., 2001).

Morfologicamente são definidos como bacilos não esporogênicos, finos ou com uma única curvatura rígida. São móveis e muitos têm um único flagelo polar quando se desenvolvem em meio líquido. Pelo menos 11 espécies de vibrio são reconhecidamente patogênicas para humanos. Para os invertebrados, e com destaque para os camarões cultivados no Brasil, pelo menos nove espécies podem ocasionar infecções entéricas, sistêmicas ou externas, tais como: *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *Vibrio* spp. (SHINOZAKI MENDES et al., 2005).

Espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas tais como *V. metschnikovii*, devem ser consideradas ao se investigar doenças relacionadas ao consumo de alimentos crus ou mal cozidos, principalmente pescados (MATTÉ et al., 2007).

O desequilíbrio que causa estresse nos camarões cultivados com o conseqüente declínio de suas defesas orgânicas favorece inicialmente a invasão por bactérias oportunistas do gênero *Vibrio* (ABCC, 2004).

O impacto da vibriose na carcinicultura é variável, mas em alguns casos pode alcançar 70% da população cultivada. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem ser canibalizados, rapidamente contaminando outros indivíduos na população (NUNES; MARTINS, 2002).

## 2.2 Patogenicidade

Os mecanismos de patogenia dos vibrios não estão completamente esclarecidos. A maior parte dos vibrios produz poderosas enterotoxinas. O *V. cholerae* produz certo número de outras toxinas, incluindo a hemolisina, uma toxina semelhante à tetrodotoxina e uma outra idêntica à shiga-toxina. As estirpes patogênicas de *V. parahaemolyticus* são conhecidas por produzirem uma hemolisina termo-estável (Vp-TDH) responsável pela reação de Kanagawa, mas está atualmente documentado que também os *V. parahaemolyticus* negativos à reação de Kanagawa podem produzir doença (HUSS, 1997).

Algumas espécies de vibrios não-coléricos podem produzir enterotoxinas similares às descritas para *V. cholerae*. Além disso, certas espécies são capazes de produzir doença invasiva que é mais similar à desintéria causada por *Shigella*; outras espécies, em particular *V. vulnificus*, podem invadir os linfáticos intestinais e produzir septicemia. As infecções extra-intestinais causadas por *Vibrio* são mais comumente infecções de feridas ou otites externas, em casos onde soluções de continuidade da pele foram contaminadas durante a prática de natação ou navegação em águas marinhas contaminadas ou manipulação de frutos do mar infectados (KONEMAN et al., 2001).

Várias espécies de *Vibrio* incluindo *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *V. splendidus* foram identificados como agentes patogênicos graves para vários animais aquáticos cultivados principalmente o camarão (JAYASREE et al., 2006).

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão (larval, pós-larval, juvenil e adulta). O processo de infecção pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas (NUNES; MARTINS, 2002).

Os locais comumente afetados pelos vibrios incluem o órgão linfóide, hepatopâncreas, coração, glândula antenal, tecido conectivo dermal, músculo esquelético e cordão nervoso. A bacteremia na vibriose resulta na ativação da cascata coagulativa tendo como resultado o prolongamento do tempo de coagulação da hemolinfa (FRELIER et al., 2004).

A doença causada pelo *Vibrio* é descrita como vibriose ou doença bacteriana, septicemia bacteriana do peneídeo, vibriose do peneídeo, vibriose luminescente ou doença do pé vermelho (AGUIRRE-GUZMÁN, 2004).

### **2.2.1 Espécies de *Vibrio* patogênicas para humanos e animais:**

#### **a) *Vibrio cholerae***

O *Vibrio cholerae* foi descrito pela primeira vez e nomeado por Pacini em 1854; 32 anos depois, Koch isolou o microrganismo, que denominou de “Kommabacillus”, devido ao característico aspecto curvo (ou em “coma”) das células bacterianas. É o agente etiológico da cólera epidêmica e pandêmica humanas. Dentro da espécie, existe uma grande diferença entre as cepas, tanto no que se refere ao potencial patogênico como ao epidemiológico (KONEMAN, 2001).

O *V. cholerae*, agente etiológico do cólera, é o membro mais conhecido do gênero. Os membros da espécie são divididos com base nos sorogrupos descritos até hoje. O *V. cholerae* O1 e O139 são responsáveis por causar o cólera do tipo clássico, que pode ocorrer em epidemias ou pandemias mundiais (MURRAY et al., 2004).

#### **b) *Vibrio parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* é um bastonete gram-negativo halofílico, responsável por causar gastroenterites em humanos relacionada com alimentos marinhos. Infecções causadas por este microrganismo têm sido associadas com diversos sorovares: 13O e 75K (IIDA et al., 2001).

É encontrado na água do mar e em animais marinhos, em todos os continentes. Nos últimos anos, tem sido reconhecido como importante causa de toxiinfecções. Na maioria das vezes, a infecção é veiculada através de pescados consumidos *in natura* ou por cocção insuficiente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

#### **c) *Vibrio vulnificus***

A espécie *Vibrio vulnificus* possui maior relevância nas infecções extra-intestinais. As septicemias e as infecções de feridas evoluem rapidamente e são frequentemente fatais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Em humanos o consumo de pescado contaminado ou a exposição de feridas a água contaminada pode levar

à infecção sistêmica e infecção da pele com elevada taxa de mortalidade (STARKS et al., 2000).

Duas síndromes são descritas: a primeira é a virulência primária, ocorrendo em pessoas que ingeriram pescados crus; a segunda é uma forma mais severa, uma infecção rapidamente progressiva provocada pelo contato com água do mar em feridas no corpo humano ou por cortes provocados durante a manipulação ou limpeza do pescado (BLAKE et al., 1979).

#### **d) *Vibrio alginolyticus***

O *Vibrio alginolyticus* foi originalmente classificado como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*. A maioria dos isolados clínicos é proveniente de feridas superficiais ou do ouvido externo. Também foram registrados casos de gastroenterite aguda e bacteremia produzidas por este microrganismo (KONEMAN et al., 2001).

#### **e) *Vibrio mimicus***

*Vibrio mimicus* é uma espécie estreitamente relacionada com *Vibrio cholerae*. Fenotipicamente, a maioria das funções destes organismos são idênticas ou semelhantes aos encontrados em *Vibrio cholerae* (DESMARCHELIER; REICHEL, 1984).

Essa espécie foi descoberta por Davis et al. (1981) ao realizarem estudos para redefinir os parâmetros bioquímicos de *Vibrio cholerae*, tais como: tolerância a NaCl, lisina descarboxilase, manitol, manose, salicina e selobiose.

É uma bactéria gram-negativa, oxidase positiva, apresenta reação negativa para fermentação da sacarose, Voges-Proskauer, lípase (10% positiva), sendo estes testes os principais para diferenciar estas duas espécies (DAVIS et al., 1981).

#### **f) *Vibrio anguillarum***

*Vibrio anguillarum* é um patógeno primário dos peixes e é responsável por graves epidemias (vibrioses) em muitas espécies marinhas cultivadas (EGUCHI, et al., 2000).

Os testes para arginina dihidrolase, indol, oxidase e Voges-Proskauer são positivos, e negativos para lisina descarboxilase e hidrólise da esculina. Apresenta



sensibilidade ao agente vibriostático O/129 (150µg) e resistência a ampicilina (10 µg) (ALSINA; BLANCH, 1994).

**g) *Vibrio metschnikovii***

O *Vibrio metschnikovii* é um habitante natural do ambiente aquático, tem sido isolado de alimento marinho e associado com doenças em humanos (MATTE et al., 2007).

Sua temperatura de crescimento varia de 20 a 40°C, não cresce na ausência de cloreto de sódio e na presença superior a 8% de NaCl . Testes negativos para indol, produção de NO<sub>2</sub>, oxidase, urease. Apresentando reação positiva para fermentação da sacarose, Voges-Proskauer, manitol. São susceptíveis ao agente vibriostático O/129 (10 e 150 µg) (ALSINA; BLANCH, 1994).

**h) *Vibrio damsela***

*Vibrio damsela* foi primeiramente isolado em 1981 a partir de úlceras da pele de peixes e de águas de climas temperados (LOVE et al. 1981). É um bastonete gram-negativo, halofílico, facultativamente anaeróbio. Anteriormente foi classificado no gênero *Vibrio*, com base na suas características fenotípicas, a partir de 1991 este microrganismo faz parte do gênero *Photobacterium* (YAMANE et al. 2004).

**i) *Vibrio fluvialis***

Lee et al. (1981) propôs o nome *V. fluvialis*, para estirpes do grupo F. Esses autores notificaram o isolamento de *V. fluvialis* em amostras do meio ambiente e de pessoas com diarreia.

Sua temperatura de crescimento é de 20 a 40°C, necessita da presença de NaCl para seu desenvolvimento. Apresenta reação negativa para lisina e ornitina descarboxilase, urease, Voges-Proskauer e testes positivos para arginina dihidrolase, citrato, gelatinase, oxidase. Sendo susceptível ao agente vibriostático O/129 (150 µg) (ALSINA; BLANCH, 1994).

**j) *Vibrio holissae***

Esta espécie foi descrita pela primeira vez por Hickman et al. (1982) ao isolar vibrios de pacientes com diarreia.

Segundo Thompson et al. (2003d) os *V. hollisae* são cepas fenotipicamente atípicas do gênero vibrio por serem arginina dihidrolase, lisina e ornitina

descarboxilase negativos e por não crescerem em ágar TCBS. Estes autores propõem agrupar os *V. hollisae* em um novo gênero, passando a chamar-se *Grimontia hollisae*.

### **k) Outras espécies**

#### **a. *Vibrio aerogenes* sp. nov.**

*Vibrio aerogenes* sp. nov. apresenta forma de bastonete reto com ligeira curvatura, gram-negativo, espécie facultativamente anaeróbia. Fermenta glicose e outros carboidratos tais como celobiose, galactose, manitol, manose, sacarose e xilose. Apresenta crescimento ótimo entre 20 a 35°C e salinidade ótima de 4%, embora possa crescer em intervalo de 0 a 10% de NaCl. Esta espécie foi encontrada e identificada pela primeira vez em amostras de sedimento costeiro da Baía de Nanwan, Taiwan (SHIEH et al., 2000).

#### **b. *Vibrio agarivorans* sp. nov.**

*Vibrio agarivorans* sp. nov. É um bastonete curto, facultativamente anaeróbio, móvel por um único flagelo polar. Seu crescimento em ágar TCBS apresenta colônias verdes. Metabolismo fermentativo com produção de gás. Teste para catalase, oxidase e redução de nitrato a nitrito são positivos. Não ocorre crescimento sem adição de NaCl ao meio de cultura, sua temperatura de crescimento ótimo está entre 20 a 37°C. Foi identificada primeiramente a partir de amostras de água do Mar Mediterrâneo, na Espanha (MACIÁN et al., 2001).

#### **c. *Vibrio brasiliensis* sp. nov.**

*Vibrio brasiliensis* sp. nov. é uma bactéria facultativamente anaeróbia, fermentadora de D-glicose, manitol, nenhuma das cepas fermenta arabinose. Seu crescimento em ágar TCBS apresenta colônias amarelas com tamanho de 3mm após o período de 24h a 28°C de incubação. Não cresce na ausência de NaCl ou na presença superior a 8% de NaCl. Esta espécie foi isolada de larvas do bivalve *Nodopecten nodosus* no sul do Brasil (THOMPSON, et al., 2003a).

#### **d. *Vibrio calviensis***

*Vibrio calviensis* é uma bactéria gram-negativa, móvel por um único flagelo polar, não cresce em temperatura superior a 37°C. Cresce na presença de NaCl a

uma concentração de 1,2 a 12%, com ótimo entre 2,5 a 3,5%. Seu crescimento em ágar TCBS apresenta colônias verdes. É facultativamente anaeróbia, reduz nitrato em nitrito, apresenta reação de Voges-Proskauer negativa, teste da catalase e oxidase positivos. Apresenta susceptibilidade a ampicilina, cloranfenicol, sulfato de colistina, ácido fusídico, kanamicina, penicilina G, polimixina B, estreptomicina, tetraciclina e agente vibriostático O/129. Resistente a lincomicina, oxacilina e espectinomicina. Foi isolada de amostra de água do mar com membrana de filtro de 0,2 µm (DENNER et al., 2002).

#### **e. *Vibrio cincinnatiensis***

*Vibrio cincinnatiensis* são bactérias gram-negativas, móveis por um único flagelo polar, formam colônias amarelas em ágar TCBS, facultativamente anaeróbias, necessitando de NaCl para seu crescimento. Fermentam glicose, sacarose, D-manose, D-celobiose, L-arabinose. São produtoras de catalase, oxidase, amilase, quitinase, Dnase. Seu teste é positivo para Voges-Proskauer, lisina descarboxilase e negativos para ornitina descarboxilase, arginina dihidrolase e produção de indol. São sensíveis a 150 µg do agente vibriostático O/129 (BRAYTON et al. 1986).

#### **f. *Vibrio chagasii* sp. nov.**

*Vibrio chagasii* sp. nov. recebeu este nome em homenagem ao físico e microbiologista brasileiro Carlos Chagas. Esta nova espécie foi primeiramente isolada do peixe marinho *Scophthalmus maximus* na Noruega. Sua morfologia se apresenta como bastonete ligeiramente curvo, não cresce na ausência de NaCl, formam colônias de cor verde em ágar TCBS (THOMPSON et al., 2003b).

#### **g. *Vibrio corallitycus* sp. nov.**

*Vibrio corallitycus* sp. nov. são células gram-negativas, não formadoras de esporos, móveis por um único flagelo polar, formam colônias amarelas em ágar TCBS após incubação de 48h a 30°C. Halofílicas, necessitam de NaCl para seu crescimento com ótimo entre 1 a 7% de NaCl. Os testes para catalase e oxidase são positivos, reduzem nitrato a nitrito. São susceptíveis ao agente vibriostático O/129, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e gentamicina. Resistentes a kanamicina,

ampicilina e penicilina. Foram isoladas de corais doentes da espécie *Pollicopora damicornis* no Oceano Índico (BEM-HAIM et al., 2003).

#### **h. *Vibrio crassostreae* sp. nov.**

*Vibrio crassostreae* sp. nov., são móveis por um flagelo polar, forma colônias amarelas e translúcidas em ágar TCBS com 5mm. Células crescem a 4°C, não apresentam crescimento a 0 ou 8% de NaCl. Todas as cepas são β-galactosidase negativa, arginina-dihidrolase e gelatinase positiva. Facultativamente anaeróbias e produtoras de NO<sub>2</sub>. Todas as cepas são sensíveis a O/129. Foram isoladas de ostras (*Crassostreae gigas*) (FAURY et al., 2004).

#### **i. *Vibrio diabolicus* sp. nov.**

*Vibrio diabolicus* sp. nov., foi descrito pela primeira vez através de isolados oriundos de fontes hidrotermais do alto mar. São bastonetes gram-negativos, móveis por um único flagelo polar em meio líquido. Não luminescentes e facultativamente anaeróbios. Capazes de metabolismo fermentativo e respiratório. Testes positivos para catalase, oxidase, quitinase e reduzem nitrato a nitrito. Crescem a temperaturas de 20 a 45°C, não crescem a 4°C (RAGUÉNÈS et al. 1997).

#### **j. *Vibrio fortis* sp. nov.**

*Vibrio fortis* sp. nov., apresenta células ligeiramente curvas, forma colônias com tamanho de 4 – 5 mm de diâmetro com coloração amarela e / ou verde em ágar TCBS. Seu crescimento ocorre na temperatura entre 4 a 35°C e salinidade de 1 – 8% de NaCl. Todas as cepas são facultativamente anaeróbias, fermentam glicose e manitol. As seguintes características são positivas para todas as cepas: oxidase, catalase, β-galactosidase e produção de indol. São sensíveis a tetraciclina (30 µg) e cloranfenicol (30 µg). Foram isoladas de camarão branco *Litopenaeus vannamei* no Equador (THOMPSON et al., 2003c).

#### **k. *Vibrio furnissii***

*Vibrio furnissii* é uma bactéria gram-negativa, ligeiramente curva, móvel por um flagelo polar. Requer NaCl (1 a 6%) para seu crescimento. Fermenta glicose e outros carboidratos com formação de ácido e gás. Reação negativa para Voges-Proskauer, H<sub>2</sub>S, uréia, fenilalanina, lisina e ornitina descarboxilase, esculina e

crescimento a 10% de NaCl. Pode ser isolado de água, fezes de animais e humanos. Foi primeiramente isolado das fezes de uma mulher com gastrinterite aguda em 1969 (BRENNER et al., 1983).

#### ***l. Vibrio gigantis sp. nov.***

*Vibrio gigantis* sp. nov., células gram-negativas, curvas e móveis por um único flagelo polar. Forma colônias amarelas translúcidas com 5mm de diâmetro em ágar TCBS. Crescem a 4°C, mas não apresentam crescimento em concentrações de 0 e 8% de NaCl. Oxidase e catalase positivas, são facultativamente anaeróbias e produtoras de NO<sub>2</sub>. São sensíveis ao agente vibriostático O/129. Esta espécie foi isolada de ostras doentes (*Crassostreae gigas*) (LE ROX et al., 2005).

#### ***m. Vibrio hepatarius sp. nov.***

*Vibrio hepatarius* sp. nov., células ligeiramente curvas, facultativamente anaeróbias, seu crescimento ocorre em temperaturas variando entre 4 – 35°C, e salinidade entre 0 – 8% de NaCl. Em ágar TCBS formam colônias amarelas translúcidas com 6mm de diâmetro. Fermentam sacarose, manitol, amigdalina e glicose, mas não fermentam inositol, arabinose. Apresentam teste positivo para oxidase e catalase, produção de indol e acetoína e redução de NO<sub>3</sub>. Todas as cepas são susceptíveis ao agente vibriostático O/129 (10 e 150 µg), polimixina (300 U), tetraciclina (30 µg) e cloranfenicol (30 µg), mas são moderadamente resistentes à ampicilina (25 µg). Foram isoladas de camarão branco *Litopenaeus vannamei* no Equador (THOMPSON et al., 2003c).

#### ***n. Vibrio hispanicus sp. nov.***

*Vibrio hispanicus* sp. nov. células gram-negativas, pequenas e curvas, móveis por um flagelo polar. Em ágar TCBS formam colônias amarelas brilhantes com tamanho de 1 – 3mm de diâmetro. Seu crescimento ocorre em meios que contenham 0 – 10% de NaCl, não crescendo a 12% de NaCl, e temperatura entre 4 e 40°C. Reação positiva para oxidase, indol, citrato, redução de nitrito e α-galactosidase e negativa para Voges-Proskauer, gelatinase e urease. Susceptível ao agente vibriostático O/129 (10 e 150 µg), polimixina B (300 U) e resistente a streptomycin (25 µg) e gentamicina (10 µg). Foi isolada de água de cultivo de *Artemia* sp. na Espanha (GOMEZ-GIL et al., 2004b).

**o. *Vibrio kanaloae* sp. nov.**

*Vibrio kanaloae* sp. nov. são células ligeiramente curvadas, móveis por um único flagelo polar. Seu crescimento em ágar TCBS após o período de 48h a 28°C apresenta colônias amarelas com 5 – 10mm. Todas as cepas fermentam arabinose, mas não sorbitol, melobiose e amigdalina. Células crescem a 4°C, mas não em ausência de NaCl. Foi isolada de larvas de ostra (*Ostrea edulis*) na França (THOMPSON et al., 2003b).

**p. *Vibrio neptunius* sp. nov.**

*Vibrio neptunius* sp. nov. foi encontrada primeiramente em larvas do bivalve *Nodipecten nodosus* no sul do Brasil. São facultativamente anaeróbicos, fermentam glicose e sacarose. Não crescem na ausência de NaCl ou na presença de quantidade superior a 8% de NaCl. Seu crescimento em ágar TCBS após o período de 48h a 28°C apresenta coloração das colônias amarela. Todas as cepas utilizam citrato e apresentaram resistência a ampicilina (25 µg) (THOMPSON, et al., 2003a).

**q. *Vibrio pacinii* sp. nov.**

*Vibrio pacinii* sp. nov., bastonete gram-negativo, móvel por um flagelo polar, não luminescentes. Em ágar TCBS formam colônias amarelo brilhante, com 1,5 a 2,8 mm de diâmetro. Crescem na presença de 1,5 a 8% de NaCl e em temperaturas entre 4 e 35°C em TSB. Fermenta glicose, galactose, seu teste é positivo para Voges-Proskauer. Foram observadas sensibilidade aos antibióticos: cloranfenicol (30 µg), ácido oxálico (2 µg), oxitetraciclina (30 µg), polimixina B (300 U), tetraciclina (30 µg) e resistência a gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), streptomina (25 µg) e agente vibriostático O/129 10 e 150 µg. Foi isolada de larvas de camarão (*Penaeus chinensis*) na China (GOMEZ-GIL et al., 2003a).

**r. *Vibrio pomeroyi* sp. nov.**

*Vibrio pomeroyi* sp. nov., apresentam célula ligeiramente curva, são móveis por um flagelo polar. Crescem na presença de NaCl a uma temperatura de 4°C. Em ágar TCBS, formam colônias amarelas translúcidas. Todas as cepas utilizam D-galactose, celobiose, sacarose. Esta bactéria foi isolada de larvas do bivalve *Nodopecten nodosus* no sul do Brasil (THOMPSON et al., 2003b).

**s. *Vibrio xuii* sp. nov.**

*Vibrio xuii* sp. nov. espécie encontrada em camarões cultivados na China. São facultativamente anaeróbicos, fermentam glicose e sacarose, manose, amigdalina e arabinose. Não crescem na ausência de NaCl ou na presença de quantidade superior a 10% de NaCl. Seu crescimento em ágar TCBS após o período de 48h a 28°C apresenta colônias amarela. (THOMPSON, et al., 2003b).

Para a clínica humana, além do *V. cholerae*, existem algumas espécies de *Vibrio* que merecem destaque por serem causadores de infecções em humanos, a Tabela 1 destaca os principais requerimentos para o cultivo dessas bactérias.

**TABELA 1** – Características das espécies de *Vibrio* não coléricas clinicamente importantes.

<b>Espécie</b>	<b>Habitat natural: distribuição geográfica; modo de infecção</b>	<b>Meios para o crescimento ótimo e cultivos laboratoriais</b>	<b>Reações Químicas-chave</b>
<i>V. alginolyticus</i>	<b>Hábitat:</b> ambientes marinhos <b>Infecção:</b> a exposição da pele traumatizada a água do mar ou animais infectados	Requer suplemento com NaCl para crescimento em meios não-seletivos. Cresce em ágar sangue e em meios entéricos. Colônias amarelas em ágar Tiosulfato-citrato-bili sacarose (TCBS)	Lisina.....+ Arginina.....- Vogers-Proskauer... + NaCl a 8%.....+ NaCl a 10%.....V
<i>V. damsela</i>	<b>Hábitat:</b> ambientes marinhos. <b>Infecção:</b> infecção da pele lesada ou de feridas traumáticas a animais marinhos infectados ou água do mar contaminada.	Requer 1% de NaCl em meios de cultura não-seletivos. Bom crescimento em ágar sangue. Colônias verdes em TCBS. Desenvolvimento ótimo a 25°C.	Arginina.....+ Voges-Proskauer... + Fermentação: Glicose.....+ Manitol.....- Galactose.....+ Trealose.....+
<i>V. fluvialis</i>	<b>Hábitat:</b> distribuição mundial; endêmica em Bangladesh. Nos Estados Unidos – Costa do Golfo, Nova York e nos estuários do noroeste do Pacífico. <b>Infecção:</b> ingestão ou contato com águas contaminadas.	O suplemento de Na <sup>+</sup> nos meios de cultura é menos crítico do que para outras espécies halófilas de <i>Vibrio</i> . Colônias amarelas em ágar TCBS.	Arginina.....+ NaCl a 6%.....+ Glicose (gás).....- Hidrólise esculina.....-
<i>V. furnissii</i>	<b>Hábitat:</b> endêmica em águas do mar e estuários da Ásia.	Suplemento de Na <sup>+</sup> para crescimento ótimo em	Glicose.....+ Hidrólise esculina.....-

<i>V. hollisae</i>	<p><b>Infecção:</b> ingestão ou contato com águas contaminadas.</p> <p><b>Hábitat:</b> ambientes marinhos dos estados da Costa do Golfo e da Baía de Chesapeake.</p> <p><b>Infecção:</b> consumo de frutos do mar crus.</p>	<p>meios de cultura não-seletivos. Colônias amarelas em ágar TCBS. Requer suplemento de 1% a 2% de NaCl para crescer. Escasso crescimento em ágar TCBS e ágar MacConkey. Em ágar sangue, pesquisar colônias oxidase-positivas.</p>	<p>Aminovalerato.....-</p> <p>Glutarato.....+</p> <p>Indol.....+</p> <p>Lisina.....-</p> <p>Arginina.....-</p> <p>Ornitina.....-</p> <p>Motilidade (após 7dias).....-</p> <p>Uréia.....-</p>
<i>V. metschnikovii</i>	<p><b>Hábitat:</b> distribuição mundial em águas doces e marinhas com vegetação, rios, esgotos; também em lagostins, caranguejos e lagostas.</p> <p><b>Infecção:</b> agente causal da cólera das aves; exposição ou ingestão de águas ou animais contaminados.</p>	<p>Cresce bem na maioria dos meios de isolamento de laboratório. O suplemento de sódio não é tão crítico quanto para os vibriões coléricos halofílicos. Colônias amarelas em ágar TCBS.</p>	<p>Oxidase.....-</p> <p>Nitratos.....-</p> <p>Voges-Proskauer.....+</p>
<i>V. mimicus</i>	<p><b>Hábitat:</b> águas costeiras, lagostins e ostras.</p> <p><b>Infecção:</b> ingestão de frutos do mar, malcozidos.</p>	<p>Cresce em meio para isolamento de entéricos. Colônias verdes em ágar TCBS.</p>	<p>Sacarose.....-</p> <p>Manitol.....+</p> <p>Ornitina.....+</p> <p>Voges-Proskauer.....-</p>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<p><b>Hábitat:</b> distribuição mundial em águas doce e de mar.</p> <p><b>Infecção:</b> Ingestão de frutos do mar contaminados.</p>	<p>Cresce lentamente em meios não-seletivos. Pesquisar colônias oxidase-positivas em ágar sangue. Colônias verdes em ágar TCBS.</p>	<p>Lisina.....+</p> <p>Arginina.....-</p> <p>Voges-Proskauer.....-</p> <p>Lactose.....-</p> <p>Indol.....+</p> <p>Urease.....V</p>
<i>V. vulnificus</i>	<p><b>Hábitat:</b> águas costeiras e estuários.</p> <p><b>Infecção:</b> Ingestão de ostras cruas; exposição de feridas traumáticas a animais infectados ou a águas contaminadas.</p>	<p>Requer NaCl a 1% para crescimento. Desenvolve-se bem em ágar sangue. Colônias verdes (85%) ou amarelas (15%) em ágar TCBS.</p>	<p>Lactose.....+</p> <p>Lisina.....+</p> <p>Arginina.....-</p>

V: variável, 11% - 89%; +: 90% ou mais de cepas positivas; -: 90% ou mais de cepas negativas. (Fonte: KONEMAN et al.; 2001).



### **3. ANTIBIÓTICOS: BREVE REVISÃO.**

Muitas culturas da antiguidade (3.000 AC), incluindo Chineses, Egípcios e Gregos, já se utilizavam de fungos para tratar infecções. Isto funcionava porque alguns fungos produzem substâncias antibióticas. Todavia, eles não tinham a mínima idéia da razão da cura nem podiam isolar o princípio ativo (ANDRADE, 2007).

No ano de 1935 foi demonstrado que o azo corante vermelho protosil protegia camundongos contra a infecção sistêmica por estreptococos e curava pacientes dessa infecção. Pouco tempo depois foi constatado que o protosil era clivado no organismo, liberando a *p*-aminobenzeno sulfonamida ou a sulfanamida, cuja atividade antimicrobiana foi constatada. Em 1942 a penicilina G foi descoberta por Fleming ao observar que o fungo *Penicillium* impedia a multiplicação dos estafilococos (MURRAY, et al., 2004; AMATO NETO, et al., 1994).

As características do antibiótico ideal seriam: ter atividade antibacteriana sobre amplo espectro; ser absorvido por via oral e parental; ter fácil distribuição pelos tecidos e líquidos orgânicos, atingindo concentração bactericida; não sofrer destruição por enzimas tissulares; não provocar efeitos irritantes, tóxicos ou alérgicos no hospedeiro; não induzir o desenvolvimento de estirpes resistentes; não provocar diminuição da resistência do organismo do hospedeiro; não ter efeitos teratogênicos; produzir concentrações elevadas e por tempo prolongado; ser facilmente obtido em escala industrial e a baixo custo (TAVARES, 1996).

Nas décadas seguintes à descoberta da penicilina, foi desenvolvida ou descoberta a maioria das classes de antibióticos que existem até hoje. O que notamos atualmente é uma desaceleração de novas descobertas, seja pelos altos custos que geram cifras superando os 500 milhões de dólares e o tempo que leva para o seu lançamento que varia de 8 a 10 anos. Isto faz que o retorno dessas cifras seja menor que o de outras classes de medicamentos (CEFAR, 2006).

#### **3.1 Mecanismos de ação dos antibióticos**

Segundo a sua ação, os antibióticos são classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Bactericidas são aqueles que provocam alterações incompatíveis com a sobrevivência bacteriana; bacteriostáticos são os que inibem o crescimento e a

reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata, sendo reversível o efeito uma vez retirado à droga (TAVARES, 1996).

Mecanismo de ação consiste na descrição de processos moleculares que permitem a atuação do fármaco. Poucos são os compostos que têm seus mecanismos de ação completamente elucidados. Existem muitas teorias e vários modelos que tentam chegar a essa compreensão. O fármaco atua em determinado local denominado **sítio de ação** ou **biofase**, desde que aí chegue em concentrações adequadas, para o que concorrem processos de absorção e distribuição (FUCHS; WANNMACHER, 1999).

Os compostos antimicrobianos são produzidos por actinomicetos, fungos, bactérias ou substâncias sintéticas (macrolídeos) que interferem em algum processo metabólico bacteriano essencial sem promover efeitos danosos ao hospedeiro. Mesmo com grande número de compostos disponíveis, os sítios de ação são limitados (CEFAR, 2006).

A propriedade fundamental de um antibiótico é a toxicidade seletiva, que corresponde à sua capacidade de destruir microrganismos ou reduzir a velocidade de sua multiplicação (alto parasitotropismo), sem alterar de forma significativa as correspondentes funções ou estruturas das células do hospedeiro (baixo organotropismo); o antibiótico ideal é aquele dotado de máximo parasitotropismo e de organotropismo nulo (AMATO NETO, et al., 1994).

O mecanismo de ação dos antibióticos é exercido essencialmente por:

#### **a) Interferência na síntese da parede celular:**

A parede celular tem constituição diferente conforme a bactéria seja gram-positiva ou gram-negativa. Todas apresentam em comum um mucopeptídeo, o peptidoglicano, um polímero mucocomplexo rígido, constituído por monômeros formados de açúcares aminados N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligados por pontes de aminoácidos. Esta constituição da parede, variável com o tipo de microrganismo, origina diferenças na permeabilidade às drogas, fato de importância no entendimento do mecanismo de ação dos antibióticos, que devem penetrar na célula para atingir seu local de ação. Dos antibacterianos que atuam neste nível, os mais usados são os  $\beta$ -lactâmicos. Didaticamente podemos dividir a síntese da camada de peptidoglicano em três etapas; uma ocorrendo no citoplasma, outra na membrana citoplasmática e a terceira externamente à membrana (TAVARES, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

**b) Alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática:**

Abaixo da parede celular e circundando o citoplasma está a membrana citoplasmática ou interna, ela possui uma permeabilidade seletiva que controla a passagem de substâncias nutrientes para o interior da célula e a saída de dejetos resultantes do catabolismo. Os antibióticos que atuam na permeabilidade da membrana citoplasmática assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças à presença, em sua molécula, de grupamentos básicos ( $\text{NH}_3^+$ ) e de uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando alcança a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície. A intercalação das moléculas do antibiótico na membrana provoca uma desorganização, com saída dos componentes celulares e morte da bactéria (TAVARES, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

**c) Interferência na replicação do DNA:**

O DNA cromossômico é constituído por duas cadeias de nucleotídeos em espiral, as quais se encontram enroladas de modo fortemente apertado, a fim de ocupar o menor espaço na célula. Atua neste nível o metronidazol que através da sua degradação, forma produtos tóxicos que se intercalam na molécula de DNA quebrando-a, impedindo a síntese de DNA. Os derivados quinolônicos, inibem as subunidades A da DNA-girase e com isto o DNA tem suas espirais relaxadas, ocupando um espaço maior que o contido na bactéria. Isto explica o alongamento anormal da bactéria, que ocorre sob a influência das quinolonas, e por fim, o rompimento da célula bacteriana. E as rifampicinas que se combinam de maneira irreversível com as RNA-polimerases, bloqueando a transcrição do DNA (TAVARES, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

**d) Interferência na síntese protéica:**

A síntese protéica é um processo metabólico bastante complexo, comandado por genes cromossômicos. Este processo é iniciado com a formação do complexo de iniciação, constituído por RNA mensageiro (m-RNA), fração 30S do ribossomo e formil-metionil t-RNA (met-tRNA). A este conjunto se acopla a fração 50S formando o ribossomo 70S. Atuam no nível dos ribossomos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina e clindamicina que inibem a síntese protéica por diferentes mecanismos (TAVARES, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

### 3.2 Mecanismos de resistência

A resistência não é um fenômeno novo, no início era reconhecida como uma curiosidade científica e logo após passou a ser vista como uma ameaça à eficácia do tratamento. Sem dúvida, o desenvolvimento de novas famílias de antimicrobianos nas décadas de 1950 e 1960 e as modificações dessas moléculas nas décadas de 1960 a 1980 nos levou a acreditar que sempre poderíamos combater os agentes patógenos. A geração de medicamentos novos está se esgotando e são poucos os incentivos para elaborar novos antimicrobianos que permitam combater os problemas mundiais da farmacoresistência (OMS, 2001).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antibacterianos (resistência primária), pois somente concentrações inviáveis *in vivo* exerceriam efeito sobre elas. Sob exposição continuada a antimicrobianos, bactérias apresentam resistência adquirida (secundária), decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa (FUCHS; WANNMACHER, 1999).

Os primeiros relatos sobre resistência começaram a surgir nos primórdios de sua liberação para venda ao público. Mesmo nos dias atuais trabalhos científicos nesta área ainda mostram o surgimento de novas cepas resistentes a antibacterianos que foram identificados há pouco tempo (CEFAR, 2006).

A resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça grave e cada vez maior para a saúde pública, sendo um problema crescente no mundo, que envolve cada dia mais espécies bacterianas e novos mecanismos de resistência (DIAZ et al., 2006).

A maioria das bactérias é resistente a alguns antibióticos. A bactéria se multiplica rapidamente, passando por várias divisões de células diariamente. Algumas células podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente que podem proporcionar resistência a algum antibiótico, adquirindo assim uma vantagem competitiva quando confrontada com esse antibiótico (DECAMP; MORIARTY, 2006).

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana e todas as amostras desta espécie têm esta propriedade. Na adquirida, somente uma parte das amostras é resistente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Para que ocorra a resistência adquirida a antibióticos, é necessário um ganho ou alteração temporária ou permanente da informação genética bacteriana. A maioria dos genes de resistência está presente em plasmídios, que podem ser

trocados com elementos cromossomiais. A resistência a antibióticos pode ser realizada por três mecanismos principais (STROHL et al., 2004):

**a) diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antibiótico:**

Diminuição das concentrações do antibiótico 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 microrganismo. Os organismos gram-negativos podem limitar a penetração de certos agentes, incluindo os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as tetraciclinas e o cloranfenicol, pela alteração de número e da estrutura das porinas presentes na membrana externa (STROHL et al., 2004; CEFAR, 2006).

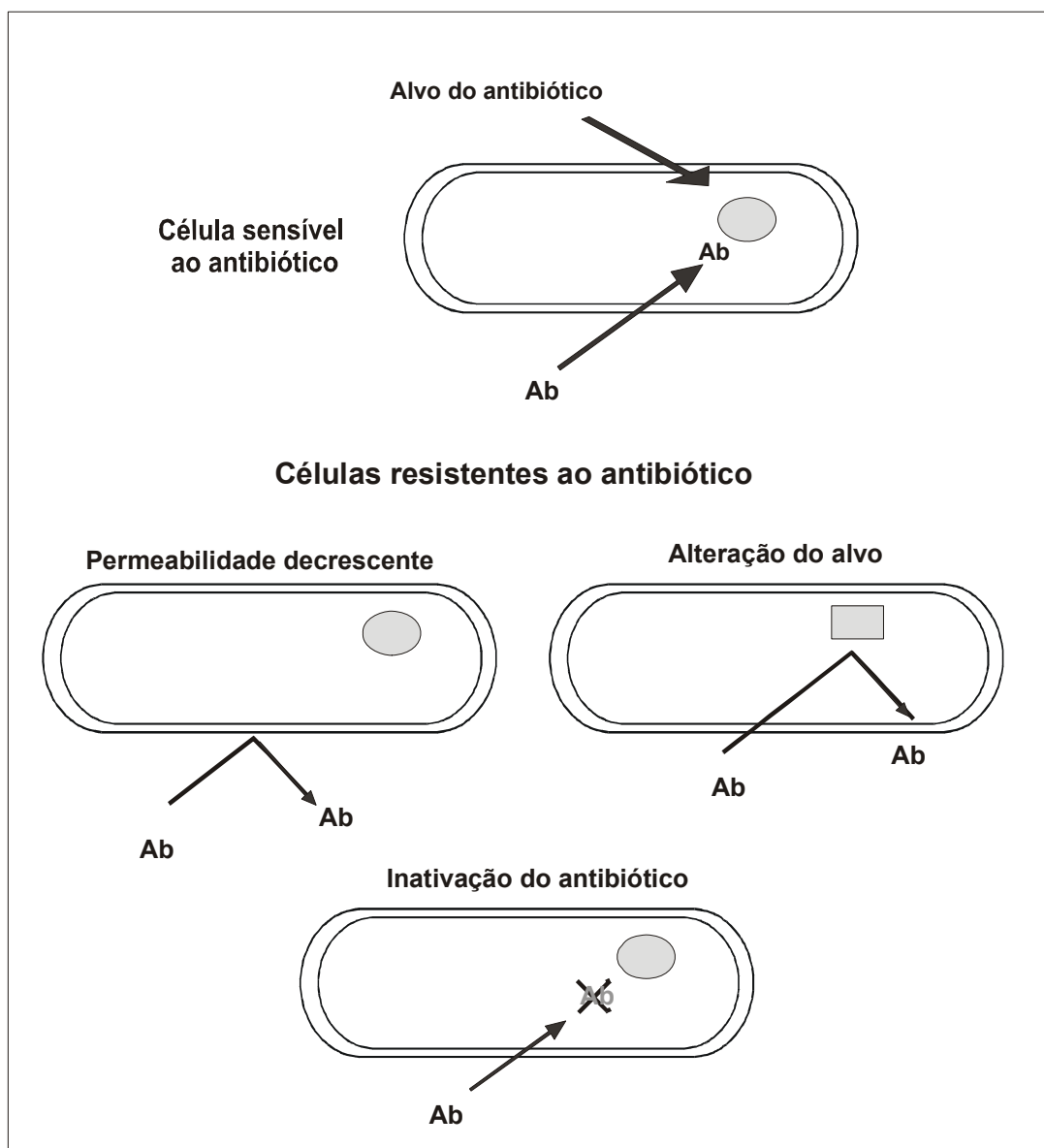
**b) Alteração do sítio-alvo do antibiótico:**

Modificações na estrutura dos sítios onde os antibióticos 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 antibiótico insuficientes para que se liguem a todos estes locais disponíveis, o que permite ao microrganismo resistir aos efeitos. O *Staphylococcus pneumoniae* resistente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresenta alteração em uma ou mais das principais proteínas ligantes à penicilina, resultando na menor ligação do antibiótico ao seu alvo (STROHL et al., 2004; CEFAR, 2006).

**c) Obtenção da habilidade de destruir ou modificar o antibiótico:**

Algumas enzimas são capazes de inativar os antibióticos por meio de hidrólise, mecanismo este responsável pela inativação das penicilinas ou por modificação da estrutura química, como visto na inativação do cloranfenicol por vários patógenos (STROHL et al., 2004; CEFAR, 2006).

Os três mecanismos de resistência, descritos acima, estão ilustrados na Figura 3:



**FIGURA 3:** Representação dos três mecanismos comuns de resistência a antibióticos.

Essa pressão seletiva é resultado de uma combinação do uso excessivo que se faz em muitas partes do mundo, em particular para combater infecções menores, do uso incorreto por falta de acesso a um tratamento apropriado e de uma subutilização devido à falta de recursos financeiros para completar os tratamentos (OMS, 2001).

Um conceito que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz a resistência e sim atua como um selecionador dos mais resistentes no meio de uma população (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

### 3.3 Plasmídios de resistência

Diversidade genética em ambiente aquático é caracterizada pela presença de dois sistemas genéticos diferentes, compostos de DNA cromossomal e extra-cromossomal. DNA cromossomal é portador do banco genético da célula bacteriana, contendo todos os genes que são essenciais para o crescimento, divisão da bactéria e replicação em estrita sincronia com o tempo do ciclo celular. O DNA extra-cromossomal está presente na célula em separado, são pequenas seqüências de fragmentos, e incluem fagos, plasmídios, *transposons*, e inserção de seqüências (SIGEE, 2005).

A habilidade de transferir DNA através do contato célula–célula foi descoberta pela primeira vez em 1950 usando *Escherichia coli*. A transferência de informação genética entre diferentes cepas de *E. coli*, depende da presença em algumas células (denominadas células doadoras) de um pequeno cromossomo “extra” chamado fator – F (fertilidade). Subsequentemente ao descobrimento do fator – F, muitos outros elementos de DNA extra-cromossomiais, chamados plasmídios, foram descobertos (MOAT et al., 2002).

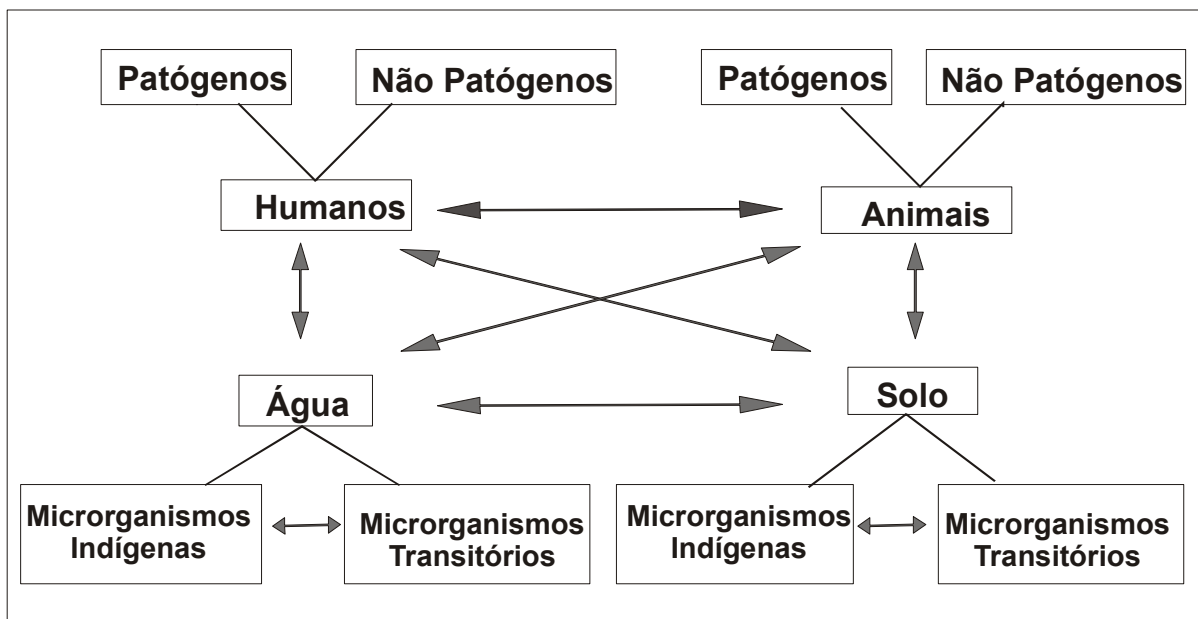
Quando o material genético é dotado de capacidade de auto-replicação, recebe o nome de *replicon*, como acontece com os cromossomos, plasmídios e bacteriófagos; os *transposons*, ao contrário, não são auto-replicativos e, para atuar, devem estar sempre agregados a um *replicon* (AMATO NETO et al., 1994).

Os plasmídios são capazes de autoduplicação independente da replicação cromossômica e podem existir em número variável. São exemplos de plasmídios: fatores sexuais (fator – F), fatores de resistência a antibióticos (fator – R), plasmídio de fixação de N<sub>2</sub>, etc. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Os *transposons* são constituídos por número pequeno de seqüências de DNA, capazes de provocar o fenômeno da **transposição**, que corresponde à fácil movimentação dos *replicons* (cromossomos, plasmídios e bacteriófagos), por intermédio dos quais são transferidos de uma bactéria a outra. Admite-se que a existência de *transposons* de resistência dá explicação à emergência de múltipla resistência bacteriana a antibióticos (AMATO NETO et al., 1994).

Microrganismos podem se mover facilmente entre os ecossistemas de seres humanos e animais para o solo e a água e vice – versa. Desta forma, genes resistentes adquiridos por organismos num ecossistema podem ser facilmente

transferidos entre organismos em diferentes ecossistemas (Figura 4) (NWOSU, 2001).



**FIGURA 4** – Representação esquemática das inter-relações de microrganismos e sua movimentação através dos quatro principais ecossistemas. O movimento ecológico dos microrganismos entre solo, água, humanos e animais paralelo à evolução e espalhamento de genes de resistência (NWOSU, 2001).

### 3.4 Técnicas de avaliação da resistência bacteriana

Eficácia microbiológica corresponde à capacidade de um antibacteriano eliminar (efeito bactericida) ou inibir a multiplicação das bactérias (efeito bacteriostático) (FUCHS; WANNMACHER, 1999).

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Muitos laboratórios de microbiologia clínica usam, de forma rotineira, o método de disco-difusão em ágar para testar patógenos comuns de crescimento rápido de certas bactérias fastidiosas (NCCLS, 2003a)

Os testes de diluição em caldo ou ágar são utilizados para a determinação da sensibilidade *in vitro* de um microrganismo a um agente antimicrobiano. Por este método se determina Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo (OPAS/ANVISA/SVS, 2006).

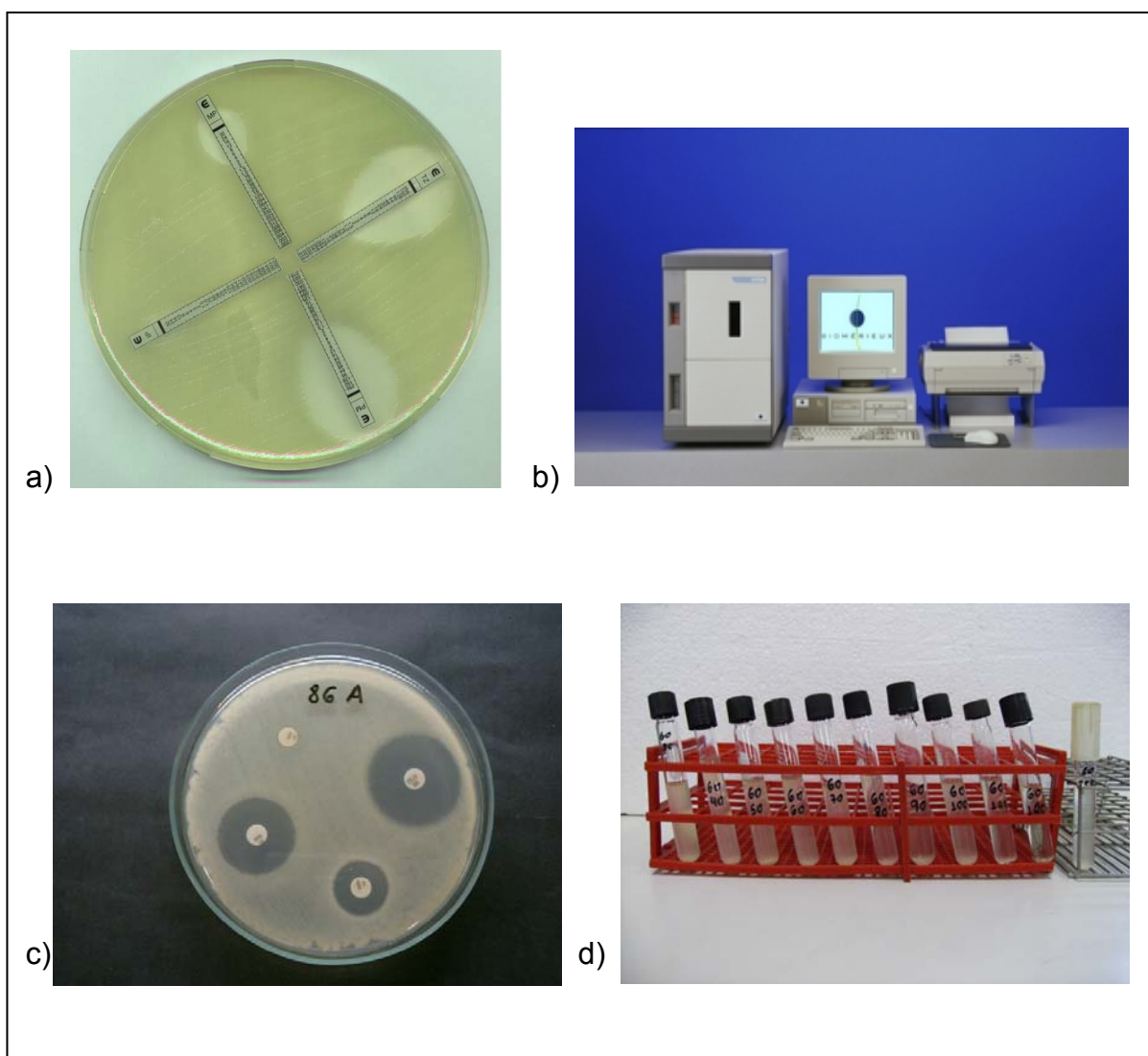
O *E test* é um novo conceito para testes quantitativos de sensibilidade, baseado em gradiente predefinido do antimicrobiano incorporado em uma fita plástica. É usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de



antimicrobianos ou de antifúngicos, inclusive em anaeróbios, microbactérias e fungos. A realização do *E test* é muito semelhante ao método de disco-difusão em ágar, porém em vez de aplicarmos os discos de papel de filtro sobre a placa de meio de cultura inoculada com o microrganismo, colocamos as fitas do *E test*, obtendo-se assim o valor da concentração inibitória mínima do agente testado (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Modernamente, métodos automatizados vêm sendo implantados na rotina de laboratórios clínicos, permitindo a rápida realização de culturas e determinação da sensibilidade dos microrganismos isolados. Dentre os vários aparelhos automatizados para realização do antibiograma existentes, se destacam entre eles o sistema Vitek (bioMérieux Vitek, USA), MicroScan Walkaway (Dade, USA), ATB-plus (bioMérieux, France) e Sensititre ARIS (Radiometer América, USA). Além da rapidez, os aparelhos automatizados reduzem a possibilidade de erros técnicos e permitem a realização simultânea de grande número de testes simultâneos. Em contrapartida, os sistemas automatizados têm custo elevado, motivo pelo qual sua utilização é mais encontrada em laboratórios com grande atividade microbiológica (TAVARES, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

O método de disco-difusão em ágar é ainda o mais utilizado por apresentar a vantagem da grande flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, seu baixo custo, sua constante padronização metodológica pelo NCCLS (*National Comimitee for Clinical Laboratory Standards*) e sua fácil interpretação pelos clínicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).



**FIGURA 5** – a) Representação esquemática do método *E-test*. (Fonte: Unifesp/LEMC); b) Sistema Vitek (bioMérieux Vitek), agrupa inoculador e incubador em um mesmo módulo (Fonte: bioMérieux Espanha); c) Representação do antibiograma pelo método do disco-difusão; d) Representação do método da diluição em caldo (CIM).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Origem das cepas

Foram selecionadas para avaliação de resistência antimicrobiana, cepas de *Vibrio* que fazem parte da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado – LABOMAR/UFC.

As cepas são provenientes de amostras de água de cultivo e hepatopâncreas de camarões cultivados em três fazendas do Estado do Ceará localizadas próximas aos Rios Acaraú, Coreaú e Jaguaribe, de acordo com o mapa ilustrado na Figura 6, (LIMA, 2007). Os *Vibrios* foram identificados, bioquimicamente, conforme a chave de identificação de Alsina e Blanch (1994).

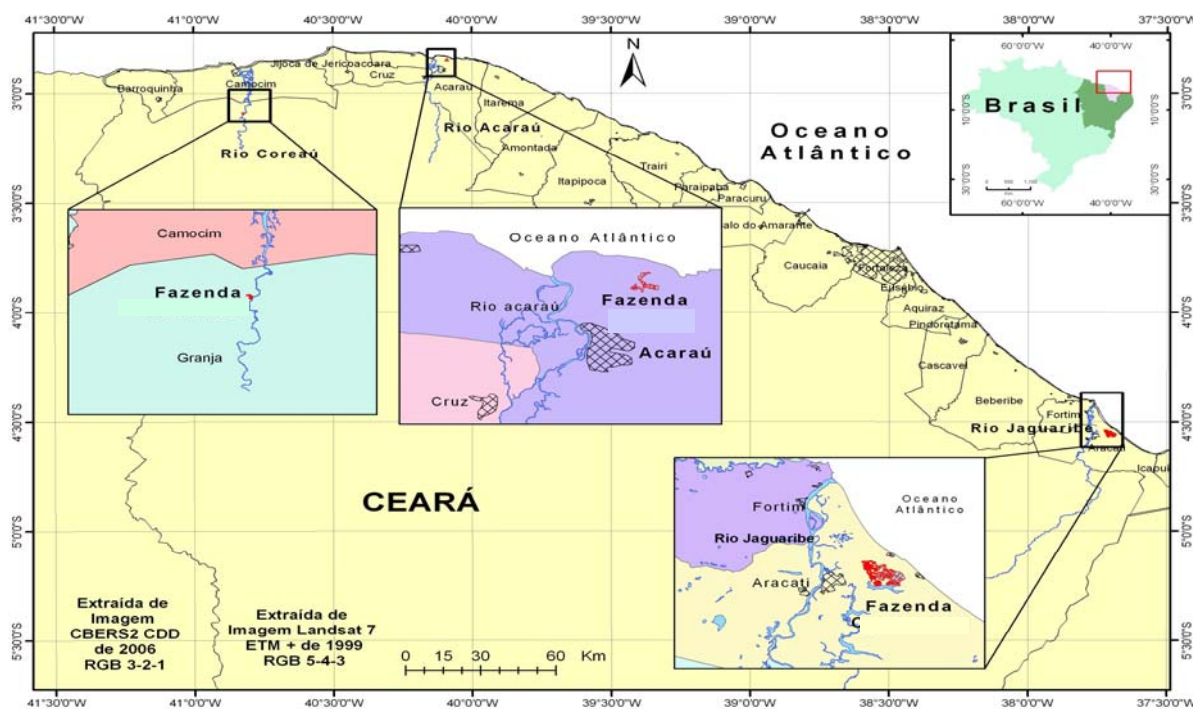


FIGURA 6 – Mapa com a localização dos pontos de coleta.

Os antibióticos foram selecionados de acordo com o espectro de ação e de acordo com as classes dos antimicrobianos aos quais pertencem.

A identificação das cepas e seus respectivos estuários de origem estão dispostos na Tabela 2.

TABELA 2 – Relação do local de origem e identificação dos isolados.

Estuário de origem	Amostra de origem	Código	Identificação
Rio Coreaú	Água do viveiro	AV 57	<i>Vibrio marinus</i>
		AV59	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV60	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV61	<i>Vibrio tubiashii</i>
	Hepatopâncreas	HP19	<i>Vibrio sp.</i>
		HP20	<i>Vibrio sp.</i>
		HP21	<i>Vibrio sp.</i>
		HP51	<i>Vibrio fluvialis</i>
		HP52	<i>Vibrio fluvialis</i>
		HP54	<i>Vibrio hispanicus</i>
		HP101	<i>Vibrio mimicus</i>
HP110	<i>Vibrio vulnificus</i>		
Rio Acaraú	Água do viveiro	AV65	<i>Vibrio hispanicus</i>
		AV66	<i>Vibrio hispanicus</i>
		AV68	<i>Vibrio mediterranei</i>
		AV133	<i>Vibrio mimicus</i>
	Hepatopâncreas	HP70	<i>Vibrio mimicus</i>
		HP71	<i>Vibrio metschnikovii</i>
		HP77	<i>Vibrio metschnikovii</i>
		HP120	<i>Vibrio metschnikovii</i>
		HP123	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Rio Jaguaribe	Água do viveiro	AV86	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV87	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV89	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV91	<i>Vibrio mimicus</i>
		AV134	<i>Vibrio mimicus</i>
	Hepatopâncreas	HP82	<i>Vibrio mimicus</i>
		HP83	<i>Vibrio harveyi</i>
		HP84	<i>Vibrio mimicus</i>
		HP85	<i>Vibrio mimicus</i>
HP78		<i>Vibrio mediterranei</i>	

#### 4.1.2 Verificação da pureza das cepas

Antes de serem submetidas aos testes frente aos antimicrobianos, a pureza dos isolados foi verificada através da análise da morfologia colonial (Agar TCBS) e morfotintorial das células bacterianas através da técnica de Gram.

#### 4.1.3 Morfologia das colônias (crescimento sobre o meio Agar TCBS)

As culturas bacterianas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion a 1% de NaCl (BHI 1%), após o período de 24h/28°C, foi feito um inóculo por esgotamento sobre a superfície do ágar TCBS.

Decorrido o tempo de incubação em estufa bacteriológica (24h/28°C), foi verificada a homogeneidade de tamanho e forma das colônias bem como a característica de utilização ou não da sacarose do meio de cultura.

#### 4.1.4 Análise morfotintorial das células (técnica de Gram)

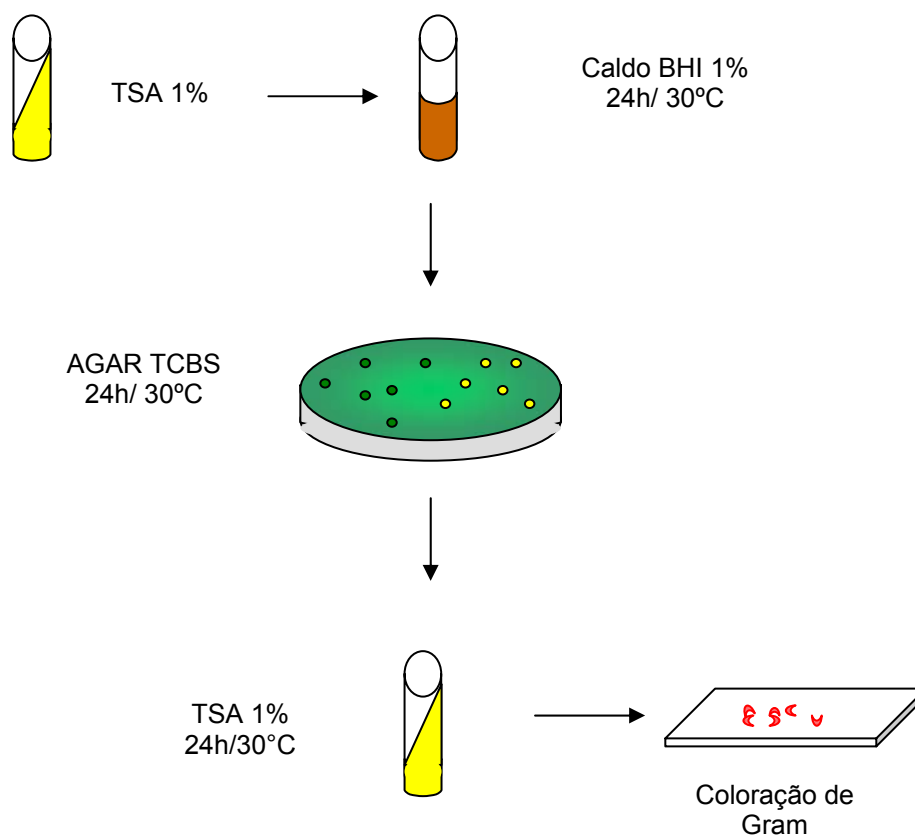
Para verificar as características das paredes celulares dos isolados bacterianos foi empregada a técnica da coloração de Gram, que segundo Levy (2004) é utilizada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes.

A estrutura da parede da célula bacteriana tem uma importância prática e direta, porque o tipo de estrutura da parede celular é responsável pela reação frente à coloração de Gram. Esta coloração diferencial divide a maioria das bactérias em dois grupos: as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Nos procedimentos envolvidos na coloração de Gram, as células são: (1) coradas com **crystal violeta**, (2) tratadas com **iodo** para formar um complexo violeta/iodo no interior da célula, (3) lavadas com uma mistura de solventes orgânicos (**álcool-acetona**), e (4) coradas com um corante de contraste vermelho, a **safranina**. Nas bactérias gram-negativas, o complexo é removido da célula (*i.e.*, as células tornam-se incolores) devido ao rompimento da membrana externa, rica em lipídios, pela mistura de solventes orgânicos álcool-acetona. Estas células devem ser contracoradas para serem observadas ao microscópio óptico; este contraste é fornecido pela safranina. As bactérias gram-positivas aparecem em azul-púrpura quando observadas ao

microscópio, e as gram-negativas são coradas em vermelho pela safranina (KONEMAN et al., 2001).

Foi verificada a morfologia das células bacterianas e a característica de parede determinada pelos corantes empregados.

A Figura 7 ilustra os procedimentos realizados para a verificação das características coloniais e de parede celular dos isolados.



**FIGURA 7** – Fluxograma da verificação da pureza das cepas.

## 4.2 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

### 4.2.1 Teste de difusão em disco

Culturas puras de *Vibrio*, já identificadas e purificadas, foram semeadas em TSA 1% de NaCl a 30°C/24h. Posteriormente, 3 a 5 colônias foram selecionadas e emulsionadas em solução salina estéril 0,85% até se obter uma turvação equivalente à turbidez do tubo 0,5 na escala de McFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal B542) variando entre 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625nm. A turbidez óptica comparável a solução padrão de McFarland equivale a uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (NCCLS, 2003a).

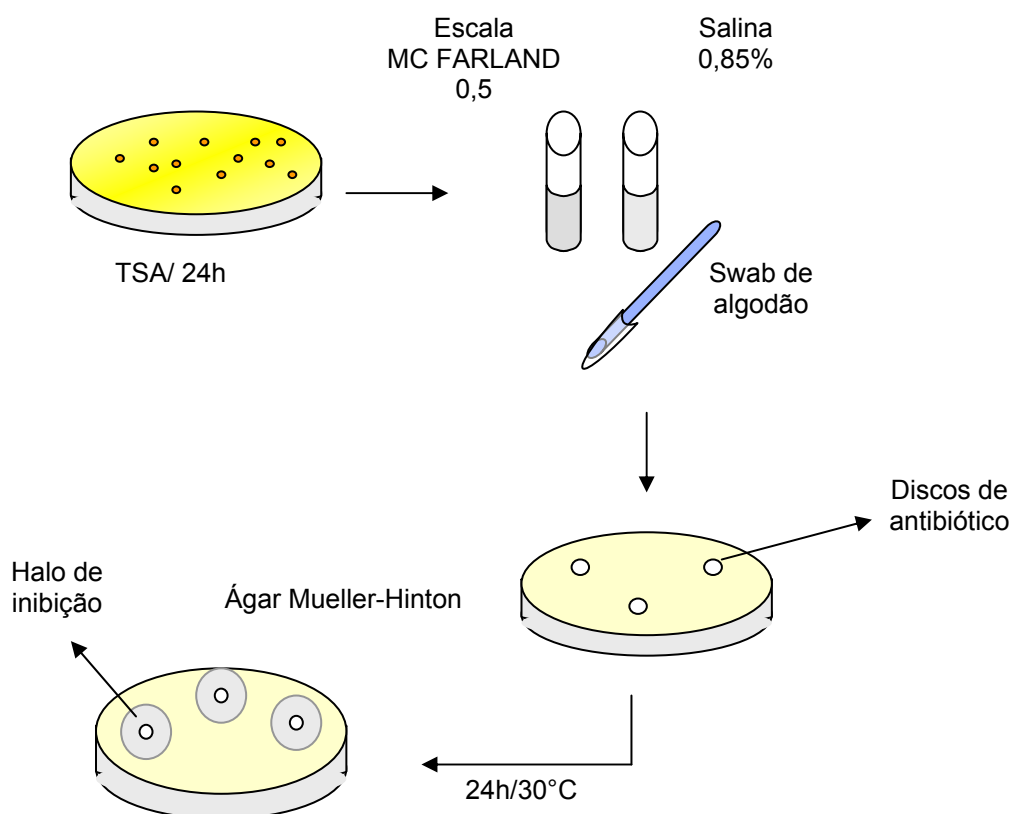
Destes tubos turvos foram semeadas placas contendo Ágar Mueller-Hinton (1% NaCl), com o auxílio de um *swab* de algodão estéril umedecido, removendo-se o excesso do inóculo nas paredes do tubo. Em seguida as placas foram mantidas entreabertas por um período de três a cinco minutos, a fim de permitir que o excesso de umidade fosse absorvido. Os discos de antimicrobianos foram depositados individualmente, com o auxílio de uma pinça estéril na superfície do ágar. Posteriormente a aplicação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em estufa por 30°C/24h.

Após o período de incubação cada placa foi examinada a fim de verificar se foi satisfatoriamente semeada. A formação de halos uniformemente circulares e a presença de um tapete confluyente de crescimento indicava a inoculação correta. Os halos de inibição total foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco.

Os halos foram medidos em milímetros utilizando-se um paquímetro, sendo considerada para leitura a área com ou sem crescimento detectável a olho nu.

O crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição foi ignorado. Entretanto, nos casos em que houve crescimento discreto de colônias dentro de um halo de inibição evidente, o teste foi repetido, conforme descrito no NCCLS (2003a).

A Figura 8 representa como foi realizado o procedimento do antibiograma pelo método de disco-difusão.



**FIGURA 8** – Fluxograma do teste de antibiograma, a partir de cepas de *Vibrio* isoladas de água de cultivo e camarão.

Como controle de qualidade para o teste de disco-difusão, foi utilizada a cepa padrão da American Type Culture Collection de *Escherichia coli* (ATCC 25922) (NCCLS, 2003a).

Para os testes de sensibilidade foram selecionados doze antimicrobianos de acordo com o espectro de ação e classes de antimicrobianos (Tabela 3).



**TABELA 3** – Lista dos antibióticos utilizados na pesquisa relacionando-os às classes de antimicrobianos e seu sítio de ação.

<b>Classes</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Sítio de Ação</b>
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10µg (GEN)	Biossíntese de proteínas
Cloranfenicol	Florfenicol 25µg (FLF)	Biossíntese de proteínas
Tetraciclina	Oxitetraciclina 30µg (OTC)	Biossíntese de proteínas
	Tetraciclina 30µg (TET)	Biossíntese de proteínas
Aminopenicilina	Ampicilina 10µg (AMP)	Biossíntese da parede bacteriana
Cefalosporinas	Cefoxitina 30µg (FOX)	Biossíntese da parede bacteriana
Quinolonas	Ácido Nalidíxico 30µg (NAL)	Biossíntese de ácidos nucleicos
Monobactâmicos	Aztreonam 30µg (ATM)	Biossíntese da parede bacteriana
Carbapenemas	Imipenem 10µg (IPM)	Biossíntese da parede bacteriana
Sulfonamidas	Sulfametoxazol-Trimetropin 25µg (SXT)	Biossíntese do ácido fólico
Nitrofuranos	Nitrofurantoína 300µg (NIT)	Redução enzimática

(Fonte: CEFAR, 2006).

Os perfis de resistência e sensibilidade foram estabelecidos de acordo com o Manual do fabricante dos discos de antimicrobianos (LABORCLIN, 2007), descritos na Tabela 4.

**TABELA 4** – Tabela com os valores dos intervalos dos halos de inibição.

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistente (<math>\leq</math>)</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Sensível (<math>\geq</math>)</b>
Gentamicina 10µg	12	13 – 14	15
Florfenicol 25µg	10	11 – 15	16
Oxitetraciclina 30µg	11	12 – 14	15
Tetraciclina 30µg	11	12 – 14	15
Ampicilina 10µg	13	14 – 16	17
Cefoxitina 30µg	14	15 – 17	18
Ácido Nalidíxico 30µg	13	14 – 18	19
Aztreonam 30µg	15	16 – 21	22
Imipenem 10µg	13	14 – 15	16
Sulfametoxazol-Trimetropin 25µg	10	11 – 15	16
Nitrofurantoína 300µg	14	15 – 16	17

(Fonte: LABORCLIN, 2007).

### **4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Para as cepas que apresentaram resistência a oxitetraciclina no teste de disco-difusão foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foi utilizada a técnica de Diluição em Caldo (Macrodiluição), utilizando caldo Mueller Hinton acrescido de 1% de NaCl de acordo com as recomendações do NCCLS (2003b). Para verificar o efeito dos íons da água do mar sobre a bioatividade do antibiótico, foi feita uma segunda bateria de caldo Mueller Hinton utilizando como diluente água do mar ajustada para 10ppm.

O inóculo padrão foi obtido a partir da suspensão de colônias em tubos contendo solução salina 0,85% NaCl até obter turbidez semelhante a solução padrão de McFarland de 0,5. Para obter a concentração final de bactérias do teste, que deve ser aproximadamente  $5 \times 10^5$ , o inóculo foi diluído 1:10, o que corresponde a uma concentração bacteriana da ordem de  $10^7$  UFC/mL (NCCLS, 2003b).

Uma alíquota de 50 $\mu$ L do inóculo foi acrescentada a tubos contendo diferentes concentrações do antimicrobiano. Como controle para o teste, foram utilizados tubos contendo Caldo Mueller Hinton 1% NaCl, inoculados e sem adição de antibiótico. Os tubos inoculados foram incubados em estufa a 30°C durante 16-20h. Após o período de incubação, o resultado era indicado pela turvação nos tubos com concentrações diferentes de antimicrobianos.

A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo no tubo detectado a olho nu (NCCLS, 2003b).

Foram avaliadas concentrações de 25 a 2000  $\mu$ g.

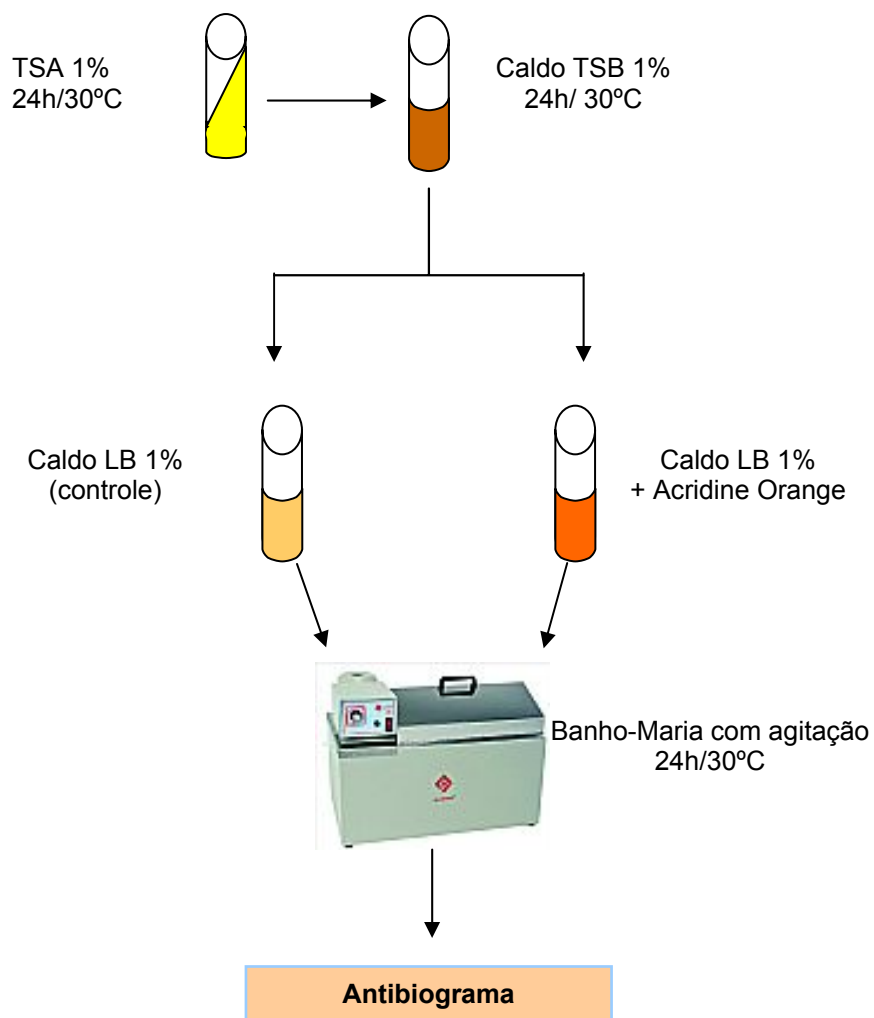
### **4.4 Cura de plasmídeo**

A presença ou ausência de plasmídios-R foi testada para as cepas que apresentaram perfil de multi-resistência aos antimicrobianos testados. Como agente de cura foi utilizado o Acridine Orange (AO) nas concentrações de 100 e 200  $\mu$ g/mL.

As cepas foram crescidas em caldo Soja Triptona (TSB) 1% NaCl, incubadas por 24h/30°C em estufa bacteriológica. Após esse período de tempo, alíquotas de 200  $\mu$ L foram adicionadas aos tubos contendo caldo Luria Bertani (LB) 1% NaCl (controle) e aos tubos contendo caldo LB 1% NaCl + AO, que foram logo em seguida incubados em banho-maria com agitação constante por 24h/30°C.

A partir do crescimento dos caldos LB 1% NaCl (controle) e Caldo LB 1% NaCl + AO, procedeu-se o antibiograma para verificar se houve alteração no perfil de resistência aos antibióticos previamente testados (MOLINA-AJA et al. 2002).

O procedimento de cura dos plasmídios está ilustrado na Figura 9.



**FIGURA 9:** Fluxograma do procedimento de cura plasmidial, a partir de cepas de *Vibrio* isoladas de água de cultivo e camarão.

#### **4.5 Similaridade dos isolados baseado no perfil de resistência aos antibióticos**

Foi elaborada uma tabela binomial baseada na resposta dos isolados aos antimicrobianos testados, de forma que a expressão de resistência equivalia a 1 e sensibilidade a 0 (zero).

Esta tabela foi levada para o programa Biodiversity Pro (MACALEECE et al., 1997) que gerou um dendrograma baseado no índice de similaridade de Bray-Curtis para agrupar os perfis de resistência aos antimicrobianos testados entre as cepas de *Vibrio*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O confinamento de espécies aquáticas em tanques com alta densidade populacional, e a introdução de espécies exóticas, sem os cuidados sanitários necessários, criam condições que favorecem a introdução e o desenvolvimento de patógenos e parasitas. Para prevenir e controlar os danos decorrentes, os criadores têm utilizado produtos químicos de forma indiscriminada. Como, de um modo geral, na aquicultura a água é retirada de cursos d'água e devolvida a eles depois de passar pelos tanques, tais produtos podem ser transportados e causar impactos diversos em outros ambientes (MAXIMIANO et al., 2005).

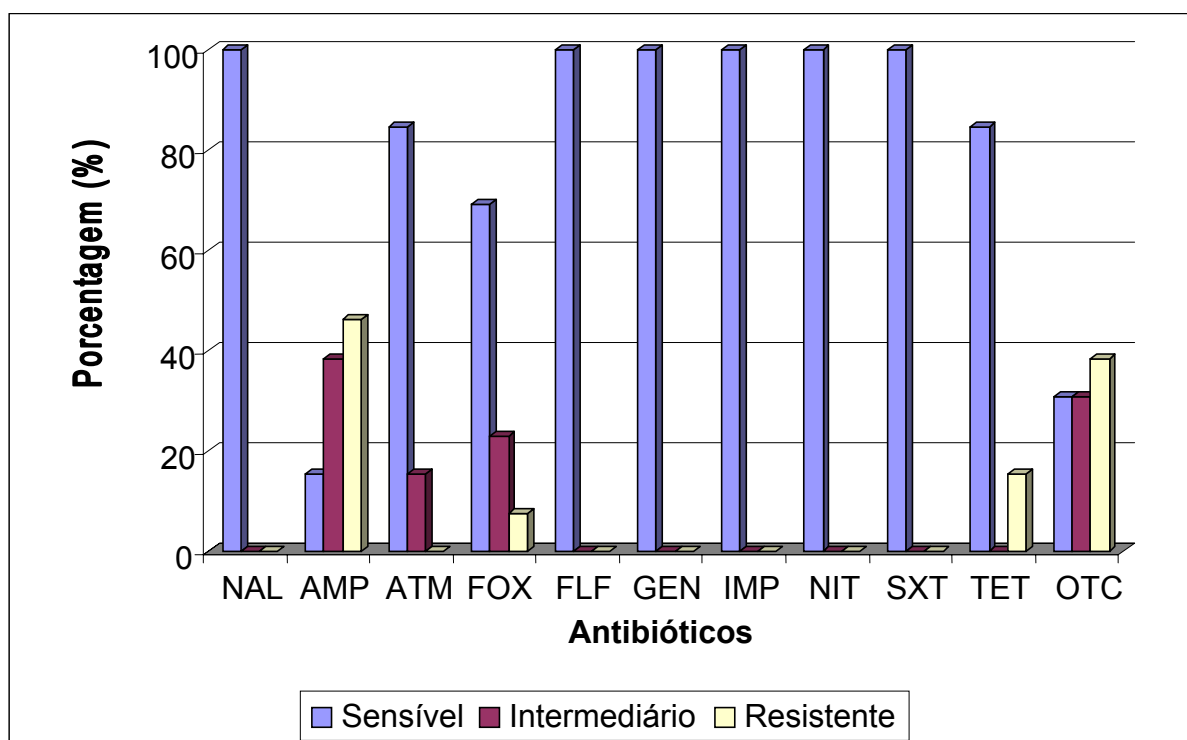
O aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambiente de produção animal e as possíveis implicações para a saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos (LIMA et al., 2006).

Os resultados desta pesquisa são provenientes da análise de 31 cepas de *Vibrio*, sendo 13 isolados da água de viveiro dos cultivos e 18 isolados oriundos de hepatopâncreas de camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*) de três fazendas do Estado do Ceará.

A Tabela 5 e a Figura 10 mostram o perfil de sensibilidade/resistência para cepas de *Vibrio* isoladas de amostras da água dos viveiros dos cultivos de camarões *Litopenaeus vannamei*.

**TABELA 5** – Percentual de sensibilidade e resistência entre as cepas de *Vibrio* sp. (N=13) isoladas da água dos viveiros de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*).

Grupo	Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente	
		n	%	n	%	n	%
Quinolonas	Ácido nalidíxico	13	100	0	0	0	0
Aminopenicilina	Ampicilina	2	15,38	5	38,46	6	46,15
Monobactâmico	Aztreonam	11	84,62	2	15,38	0	0
Cefalosporina	Cefoxitina	9	69,23	3	23,08	1	7,69
Cloranfenicol	Florfenicol	13	100	0	0	0	0
Aminoglicosídeo	Gentamicina	13	100	0	0	0	0
Carbapenemas	Imipenem	13	100	0	0	0	0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	13	100	0	0	0	0
Sulfonamidas	Sulfametoxazol-Trimetropin	13	100	0	0	0	0
Tetraciclina	Tetraciclina	11	84,62	0	0	2	15,38
	Oxitetraciclina	4	30,77	4	30,77	5	38,46



**FIGURA 10** – Gráfico do perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Vibrio* isoladas da água dos viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no Estado do Ceará.

NAL = ácido nalidíxico 30µg, AMP = ampicilina 10µg, ATM = aztreonam 30µg, FOX = cefoxitina 30µg, FLF = florfenicol 25µg, GEN = gentamicina 10µg, IMP = imipenem 10µg, NIT = nitrofurantoína 300µg, SXT = sulfametoxazol-Trimetropin 25µg, TET = tetraciclina 30µg, OTC = oxitetraciclina 30µg.

As cepas isoladas das amostras de água dos cultivos apresentaram resistência à ampicilina (46,15%), cefoxitina (7,69%), tetraciclina (15,38%), e oxitetraciclina (38,46%).

Costa (2006) analisando 39 amostras de *Vibrios* isoladas de ambiente de cultivo e de camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados no estuário do rio Coreaú - Ceará encontrou 25,64% das cepas resistentes a ampicilina e sensibilidade de todos os isolados a tetraciclina.

Os antimicrobianos ácido nalidíxico, florfenicol, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetropim se mostraram cem por cento (100%) eficientes contra os organismos testados.

Kim et al. (2003) isolaram 46 cepas de *Vibrio* sp. de amostras de água do mar e solo em fazendas no Japão, encontrando 21 isolados de água e 4 isolados de sedimento resistentes a oxitetraciclina. De acordo com esta pesquisa, entre treze isolados oriundos da água do cultivo 7 cepas (53,84%) apresentaram resistência aos antibióticos do grupo das tetraciclinas.

Pesquisa realizada por Saavedra et al. (2004) avaliando o perfil de susceptibilidade de isolados de *Vibrio* em robalos (*Dicentrarchus labrax*) e água de cultivo, encontraram cem por cento (100%) das estirpes sensíveis ao aztreonam e à tetraciclina. Em nossa pesquisa, um grande percentual dos isolados ambientais apresentou sensibilidade tanto ao aztreonam como a tetraciclina (84,62%).

Akinbowale et al., (2006) realizaram uma avaliação preliminar da ocorrência de resistência em isolados oriundos de diversas espécies aquáticas cultivadas e de ambiente a antimicrobianos incluindo os de uso comum na aquicultura em países como os Estados Unidos, Dinamarca, Noruega, Reino Unido e Canadá, encontraram cepas resistentes à ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina e sensibilidade ao florfenicol e sulfametoxazol-trimetropin.

Estes resultados são compatíveis aos encontrados nesta pesquisa onde a maioria dos isolados (84,61%) apresentou como perfil intermediário e resistente a ampicilina; 53,84% apresentaram resistência aos antibióticos do grupo tetraciclina e 100% se mostraram sensíveis a florfenicol e sulfametoxazol-trimetropin.

Os dados deste trabalho corroboram com os encontrados por Diaz et al. (2006) que ao isolar cepas de *Vibrio* em ambiente aquático, encontraram resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina (39,72%) e tetraciclina (4,59%).

O uso contínuo de um determinado antimicrobiano leva ao surgimento de cepas resistentes em espécies cultivadas e eleva a percentagem de resistência em estirpes do ambiente; portanto, a frequência de resistência antimicrobiana reflete o padrão do uso desses medicamentos (TENDENCIA; PEÑA ., 2002).

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados com 13 cepas de *Vibrio* (8 cepas de *V. mimicus*, 2 de *V. hispanicus*, 1 de *V. marinus*, 1 de *V. tubiashii*, e 1 de *V. mediterranei*) oriundas da água de viveiro dos cultivos de camarão (Tabela 6).

**TABELA 6** – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de *Vibrio* isoladas de amostras de água de viveiro dos cultivos de camarão.

Cepa	Espécie	PERFIL		
		Sensível	Intermediário	Resistente
AV57	<i>V. marinus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; ATM; NIT	–	AMP; FOX; OTC; TET
AV59	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; TET	–	AMP; OTC
AV60	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; NIT; TET	ATM; OTC	AMP
AV61	<i>V. tubiashii</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; NIT; TET	ATM	AMP; OTC
AV65	<i>V. hispanicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; TET	AMP; OTC	–
AV66	<i>V. hispanicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; ATM; NIT; OTC; TET	AMP; FOX	–
AV68	<i>V. mediterranei</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
AV86	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	AMP
AV87	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; ATM; NIT; TET	AMP; FOX	OTC
AV89	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; TET	AMP; OTC	–
AV91	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; TET	OTC	–
AV133	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; ATM; NIT;	FOX	AMP; OTC; TET
AV134	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	AMP	–

NAL = ácido nalidíxico 30µg, AMP = ampicilina 10µg, ATM = aztreonam 30µg, FOX = cefoxitina 30µg, FLF = florfenicol 25µg, GEN = gentamicina 10µg, IPM = imipenem 10µg, NIT = nitrofurantoína 300µg, SXT = sulfametoxazol-Trimetropin 25µg, TET = tetraciclina 30µg, OTC = oxitetraciclina 30µg.

A ampicilina foi o antibiótico que apresentou uma menor eficiência contra os vibrios testados apresentando perfis resistente (46,15%) e intermediário (38,46%).

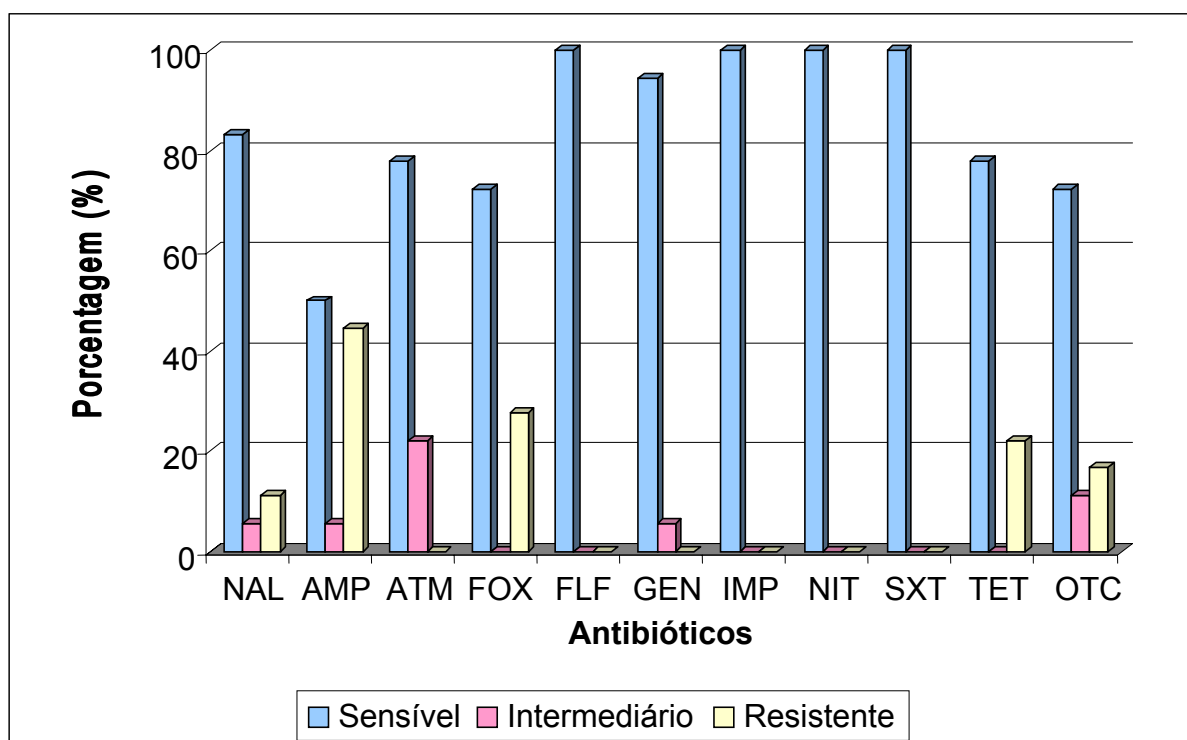
Carneiro et al. (2007) caracterizando o perfil de susceptibilidade de 21 cepas de *Vibrio* isoladas em três sistemas de cultivo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) observaram um elevado número (95,24%) de resistência a ampicilina.



Na análise dos isolados oriundos do hepatopâncreas dos camarões cultivados foi encontrada resistência aos antibióticos: ácido nalidíxico (11,11%), ampicilina (44,44%), cefoxitina (27,78%), tetraciclina (22,22%) e oxitetraciclina (16,67%) (Tabela 7, Figura 11).

**TABELA 7** – Percentual de sensibilidade e resistência entre as cepas de *Vibrio* sp. (N=18) isoladas do hepatopâncreas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados.

Grupo	Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente	
		n	%	n	%	n	%
Quinolonas	Ácido nalidíxico	15	83,33	1	5,56	2	11,11
Aminopenicilina	Ampicilina	9	50,0	1	5,56	8	44,44
Monobactâmico	Aztreonam	14	77,78	4	22,22	0	0
Cefalosporina	Cefoxitina	13	72,22	0	0	5	27,78
Cloranfenicol	Florfenicol	18	100	0	0	0	0
Aminoglicosídeo	Gentamicina	17	94,44	1	5,56	0	0
Carbapenemas	Imipenem	18	100	0	0	0	0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	18	100	0	0	0	0
Sulfonamidas	Sulfametoxazol-Trimetropin	18	100	0	0	0	0
Tetraciclina	Tetraciclina	14	77,78	0	0	4	22,22
	Oxitetraciclina	13	72,22	2	11,11	3	16,67



**FIGURA 11** – Gráfico do perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Vibrio* isoladas do hepatopâncreas de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Estado do Ceará.

NAL = ácido nalidíxico 30µg, AMP = ampicilina 10µg, ATM = aztreonam 30µg, CFO = cefoxitina 30µg, FLF = florfenicol 25µg, GEN = gentamicina 10µg, IPM = imipenem 10µg, NIT = nitrofurantoína 300µg, SXT = sulfametoxazol-Trimetropin 25µg, TET = tetraciclina 30µg, OTC = oxitetraciclina 30µg.

No presente estudo, observamos cem por cento (100%) de sensibilidade nas cepas de vibrio isoladas das amostras de hepatopâncreas ao florfenicol, antimicrobiano pertencente ao grupo dos cloranfenícolis.

Sabe-se que as drogas veterinárias e seus resíduos em alimentos, desde que usados corretamente, representam baixo risco. Apesar disso, essas drogas são consideradas uma grande ameaça à qualidade dos camarões cultivados. Os cloranfenícolis nunca foram aprovados para uso em animais destinados ao consumo humano, porque causam a anemia aplástica independentemente da dose usada. Segundo as normativas dos Estados Unidos os limites de detecção para esse compostos é de 10 ppb para EUA e 0,3 ppb para União Européia, embora a constatação de níveis de 0,01ppb já tenha sido suficiente para provocar a rejeição de camarões importados pelo mercado europeu (ABCC, 2005).

Manjusha et al. (2005) pesquisaram resistência a diferentes antimicrobianos em 119 isolados de *Vibrio* sp de camarões cultivados em diferentes pontos da Índia encontrando o seguinte perfil de resistência para os antibióticos: ampicilina (100%), gentamicina (6,25%), ácido nalidíxico (12,50%), tetraciclina (31,25%) e 100% de sensibilidade a cloranfenicol.

Entre os 12 antibióticos testados, 4 se mostraram eficientes contra os isolados de *Vibrio*. Foram eles: florfenicol, imipenem, nitrofurantoína, sulfatomexazol-trimetropin.

Roque et al. (2001) analisando a eficiência de antibióticos em 144 amostras de vibrios isoladas de cultivos de camarão observaram a sensibilidade aos antimicrobianos florfenicol (59,03%) e sulfametoxazol-trimetropim (92,36%).

Em análise do perfil de susceptibilidade de cepas de *Vibrio* oriundas de cultivos de camarão localizada no estuário do Rio Coreaú, Costa (2006) observou que os antibióticos ácido nalidíxico, gentamicina, nitrofurantoína, cefoxitina, tetraciclina e cloranfenicol foram cem por cento eficientes para todos os isolados de vibrio.

Em um estudo realizado por Tendencia e Penã. (2001) nas fazendas de cultivo de camarão nas Filipinas, ficou constatado uma maior incidência de resistência a oxitetraciclina entre os isolados das amostras oriundas das fazendas que faziam uso deste antimicrobiano incorporado à ração dos camarões em comparação com aquelas que não faziam uso dessa substância.

Nesta pesquisa observamos resistência ao grupo das tetraciclinas em 38,89% dos isolados, não sendo confirmado seu uso nos cultivos avaliados.

Resultados deste estudo mostram que dos 18 isolados (5 cepas de *V. mimicus*, 3 de *V. metschnikovii*, 2 de *V. fluvialis*, 3 de *Vibrio* sp., 1 de *V. hispanicus*, 1 de *V. mediterranei*, 1 de *V. harveyi*, 1 de *V. vulnificus*, e 1 de *V. alginolyticus*) de hepatopâncreas testados, 6 (33,33%) cepas apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano e 5 (27,7%) foram resistentes a um medicamento (Tabela 8).

**TABELA 8** – Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de *Vibrio* isoladas de amostras hepatopâncreas de camarão cultivado *Litopenaeus vannamei*.

Cepa	Espécie	PERFIL		
		Sensível	Intermediário	Resistente
HP19	<i>V. sp.</i>	SXT; IPM; AMP; FLF; GEN; ATM; NIT; OTC; TET	NAL	FOX
HP20	<i>V. sp.</i>	SXT; IPM; AMP; FLF; ATM; NIT;	GEN	NAL; FOX; OTC; TET
HP21	<i>V. sp.</i>	SXT; IPM; AMP; FLF; GEN; NIT; OTC; TET	ATM	NAL; FOX
HP51	<i>V. fluvialis</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
HP52	<i>V. fluvialis</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; TET	OTC	–
HP54	<i>V. hispanicus</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
HP70	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	AMP
HP71	<i>V. metschnikovii</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; NIT; OTC	ATM	AMP; FOX; TET
HP77	<i>V. metschnikovii</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; ATM; NIT; OTC; TET	–	AMP; FOX;
HP78	<i>V. mediterranei</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; VAN; NIT	ATM	AMP; OTC; TET
HP82	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	AMP	–
HP83	<i>V. harveyi</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; NIT; OTC ; TET	ATM	AMP
HP84	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
HP85	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
HP101	<i>V. mimicus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT	–	AMP; OTC; TET
HP110	<i>V. vulnificus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	AMP

HP120	<i>V. metschnikovii</i>	SXT; IPM; NAL; AMP; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	–
HP123	<i>V. alginolyticus</i>	SXT; IPM; NAL; FLF; GEN; FOX; ATM; NIT; OTC; TET	–	AMP

NAL = ácido nalidíxico 30µg, AMP = ampicilina 10µg, ATM = aztreonam 30µg, FOX = cefoxitina 30µg, FLF = florfenicol 25µg, GEN = gentamicina 10µg, IPM = imipenem 10µg, NIT = nitrofurantoína 300µg, SXT = sulfametoxazol-Trimetropin 25µg, TET = tetraciclina 30µg, OTC = oxitetraciclina 30µg.

Reed et al (2004) se refere à eficácia da oxitetraciclina (OTC) no tratamento de vibrioses em fazendas de camarão. De acordo com esses autores, *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* – e os menos freqüentes *V. damsela* e *V. fluvialis* – são os principais organismos responsáveis por causar vibrioses em cultivo de camarão.

Os nossos resultados mostram percentuais baixos de resistência a tetraciclina (22,22%) e oxitetraciclina (16,67%).

No Brasil o uso de oxitetraciclina é bastante comum em pisciculturas comerciais para o controle de surtos de doenças bacterianas e como medida profilática. Apesar da ampla utilização, não há regulamentação para o uso deste tipo de droga. Seu uso contínuo pode causar aumento da freqüência de isolados bacterianos resistentes e aumentar quantitativamente a resistência, dificultando tratamentos futuros e elevando o risco para a cadeia alimentar humana (PEREIRA JÚNIOR et al., 2006).

Segundo Wang et al. (2007) antibióticos tais como oxitetraciclina, tetraciclina e cloranfenicol são largamente utilizados na prática veterinária como aditivos da alimentação para promover o crescimento devido seu amplo espectro de ação contra bactérias e seu baixo custo. Entretanto, níveis residuais relativamente altos em alimentação humana podem provocar reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis podendo também comprometer o sistema imunológico humano.

O estudo da resistência antimicrobiana constitui uma área extremamente complexa da microbiologia, em especial devido à promiscuidade dos genes de resistência, a importância da transferência horizontal de genes e as múltiplas e complexas vias de fluxo gênico (FAO/OIE/WHO, 2006).

O resultado da análise do perfil de multi-resistência das cepas pesquisadas oriundas de amostras da água de viveiro e de hepatopâncreas de camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*) está indicado na Tabela 9.

**TABELA 9** – Perfil de multi-resistência das cepas de *Vibrio* isoladas de água de viveiro e hepatopâncreas de camarão cultivado.

Cepa	Espécie	Estuário de origem	Perfil de resistência
AV59	<i>V. mimicus</i>	Rio Coreaú	AMP, OTC
AV61	<i>V. tubiashii</i>	Rio Coreaú	AMP, OTC
AV86	<i>V. mimicus</i>	Rio Jaguaribe	AMP, OTC
AV57	<i>V. marinus</i>	Rio Coreaú	AMP, FOX, OTC, TET
AV133	<i>V. mimicus</i>	Rio Acaraú	AMP; OTC, TET
HP20	<i>Vibrio. sp.</i>	Rio Coreaú	NAL, FOX, OTC, TET
HP21	<i>Vibrio sp.</i>	Rio Coreaú	FOX; NAL
HP71	<i>V. metschnikovii</i>	Rio Acaraú	AMP, FOX, TET
HP77	<i>V. metschnikovii</i>	Rio Acaraú	AMP, FOX
HP78	<i>V. mediterranei</i>	Rio Jaguaribe	AMP, OTC, TET
HP101	<i>V. mimicus</i>	Rio Coreaú	AMP; OTC, TET

NAL = ácido nalidíxico 30µg, AMP = ampicilina 10µg, FOX = cefoxitina 30µg, TET = tetraciclina 30µg; OTCl = oxitetraciclina 30µg.

Os isolados que se mostraram resistentes a dois ou mais antibióticos de diferentes grupos foram considerados como multi-resistentes.

Dentre o total de 31 isolados de *Vibrio* analisados, foi observada resistência múltipla em 35,48% das cepas, onde 5 cepas foram resistentes a 2 antibióticos, 4 resistentes a 3 antibióticos e 2 cepas resistentes a 4 antibióticos. Neste estudo foram observados 7 (11 isolados) perfis de multi-resistência, sendo que o maiores perfis incluem os antibióticos AMP-FOX-OTC-TET, NAL-FOX-OTC-TET, AMP-OTC-TET e AMP-FOX-TET.

Avaliando a resistência antimicrobiana em bactérias gram-negativas isoladas da aquicultura na Austrália, Akimbowale et al. (2005) encontraram 23 isolados (26,7%) resistentes a apenas uma classe de antibióticos, 27 (31,4%) foram resistentes a duas classes, 15 (17,4%) resistentes a 3 classes, 12 isolados (13,9%) foram resistentes a 4 classes, 1 isolado (1,2%) resistente a 6 classes, 4 isolados (4,7%) foram resistentes a sete classes, enquanto dois isolados (2,3%) foram

resistentes a oito das dez classes de antibióticos testados. E um total de 44 padrões diferentes de resistência foram identificados.

Carneiro et al. (2007) pesquisaram o perfil de susceptibilidade de 115 isolados de *Vibrio* provenientes de ambiente de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) encontrando 20 espécies de vibrio (17,39%) com característica de multi-resistência.

Incidência de múltipla resistência foi divulgada por Sarter et al. (2007) ao estudar o perfil de resistência em isolados de 3 fazendas de cultivo de *P. hypophthalmus* (catfish) na região do Vietnã, encontrando estirpes de *Vibrio* com resistência múltipla a AMP-OTC-SXT-NAL e AMP-NIT-OTC.

Com relação ao local de origem das amostras, observamos que a maior incidência de multi-resistência (60%) foi proveniente dos isolados do estuário do rio Coreaú. Informação confirmada pelo estudo realizado por Costa (2006) ao analisar o perfil de resistência de 39 cepas de *Vibrio* isoladas a partir de amostras de água de cultivo e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em uma fazenda situada no estuário do rio Coreaú, observando resistência múltipla em 15,38% das cepas, com 5 cepas resistentes a 2 antibióticos e 1 cepa resistente a 3 antibióticos.

Pesquisas a cerca da incidência de múltipla resistência aos antibióticos em isolados de *Vibrio* são de grande importância para ampliar nossos conhecimentos sobre as estirpes resistentes, o consumo de drogas e seus efeitos sobre a terapia em camarão, bem como em doenças humanas (MANJUSHA et al., 2005).

As bactérias estão expostas a uma ampla gama de alterações nas condições ambientais envolvendo temperatura, pH, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, compostos tóxicos, etc. Embora elas tenham distribuição mundial e sejam encontradas nas mais diversas condições ambientais do planeta, cada grupo bacteriano está adaptado a condições ambientais restritas que proporcionam condições ideais de crescimento, e permitem um potencial máximo de sobrevivência. Alterações nas condições ambientais requerem pronta adaptação para assegurar a sobrevivência da população. Para se adaptar, a bactéria deve produzir algum componente estrutural ou funcional que lhe assegure a sobrevivência em novas condições ambientais. A produção de novos componentes requer a expressão de genes que antes não estavam se expressando (isto é, sendo transcritos), porque até então seus produtos não eram necessários à sobrevivência da célula. As características fenotípicas de uma bactéria são determinadas pelo seu genótipo e por certas condições ambientais (OLIVEIRA, 2005).

Os genes existentes nos plasmídios apenas conferem vantagens adaptativas para as bactérias, não sendo essenciais para a sua sobrevivência. Os plasmídios podem ser classificados de acordo com o caráter fenotípico que conferem à bactéria ou quanto à possibilidade de serem transferidos de uma célula bacteriana para a outra.

Muitos plasmídios e *transposons* carregam múltiplos genes de resistência, o que confere resistência a diferentes antimicrobianos, e a seleção de qualquer determinante pode conservar o plasmídio inteiro e sua resistência (LIVERMORE, 2003).

Na Tabela 10 observamos a representação do resultado obtido pelo processo de cura plasmidial para os isolados de *Vibrio* provenientes da água de viveiro e hepatopâncreas de camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*).

**TABELA 10 – Resultado do tratamento da cura de plasmídio.**

Estuário de Origem	Cepa	Antibiótico	Tratamento da cura		
			LB sem AO	LB com AO	Perda de plasmídio
			sensibilidade	sensibilidade	
Rio Coreaú	HP20	NAL	R	R	N
		FOX	R	S	P
		OTC	R	S	P
		TET	R	S	P
	HP21	NAL	R	R	N
		FOX	R	R	N
	AV57	AMP	I	S	P
		FOX	I	S	P
		OTC	R	S	P
		TET	R	S	P
	AV59	AMP	I	R	N
		OTC	R	S	P
	AV61	AMP	R	R	N
		OTC	R	R	N
	HP101	AMP	R	S	P
OTC		R	S	P	
TET		R	S	P	
Rio Acaraú	HP71	AMP	R	R	N
		FOX	R	R	N
		TET	R	R	N
	HP77	AMP	R	I	N
		FOX	R	S	P
	AV133	AMP	R	R	N
OTC		R	R	N	
TET		R	R	N	
Rio Jaguaribe	HP78	AMP	R	R	N
		OTC	R	R	N
		TET	R	R	N
	AV86	AMP	R	R	N
OTC		R	R	N	

AMP = ampicilina; FOX = cefoxitina; OTC = oxitetraciclina; TET = tetraciclina; S = sensível; I = intermediário; R = resistente; N = negativo para perda de plasmídio; P = positivo para perda de plasmídio.

Dos onze isolados testados, cinco (45,45%) isolados perderam 1 ou mais plasmídios e seis (54,54%) não perderam nenhum plasmídio.

Molina-Aja et al. (2002) realizaram cura plasmidial em 30 cepas de *Vibrio* isoladas de camarão cultivado no México, encontrando perda de um ou mais plasmídios em 80% das cepas analisadas. Dentre estas, cinco cepas (16,7%) não perderam plasmídios, dezesseis (53,3%) perderam um plasmídio, cinco (16,7%) perderam dois plasmídios, três (10,0%) perderam três plasmídios e uma cepa (3,3%) perdeu seis plasmídios.

Plasmídios contêm genes de resistência e muitas outras características; eles podem se replicar independentemente do cromossomo hospedeiro, podendo ser distinguidos por suas origens e repetições e uma única bactéria pode abrigar múltiplos plasmídios (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

A resistência plasmidial foi confirmada para as cepas AV57 (AMP, FOX, OTC, TET), HP101 (AMP, OTC, TET), HP20 (FOX, OTC, TET), AV59 (OTC) e HP77 (FOX). As duas cepas de *Vibrio* sp. (HP20 e HP21) apresentaram resistência a NAL e esta resistência se mostrou relacionada a genes cromossômicos.

De 9 isolados com perfil de resistência a ampicilina, 7 (77,7%) demonstraram que esse padrão está relacionado a genes cromossomais, uma vez que essa característica não foi perdida.

A perda de plasmídios de resistência para cepas de *Vibrio* isoladas a partir de amostras de hepatopâncreas de camarão foi observada para os antibióticos ampicilina e cefalotina não sendo confirmada para oxitetraciclina (MOLINA-AJA et al. 2002).

Em estudo realizado por Kim et al. (2004) afirmam que genes de resistência ao grupo das tetraciclina são presentes em organismos aquáticos saudáveis e doentes e em água do mar, sugerindo que o ambiente de aquicultura marinha serve como um reservatório para genes de resistência.

A presença de plasmídios-R torna possível a troca de genes de resistência entre essas bactérias e aquelas que compõem a microbiota natural do ambiente.

Este fenômeno de seleção cruzada contribui para aumento dramático do número de múltipla resistência bacteriana, aumentando assim o risco de transferência de plasmídios e codificação de resistência para microrganismos patogênicos (MIRANDA; ZEMELMAN, 2002).

Os plasmídios podem ser curados ou removidos da célula, depois de serem submetidos a diferentes condições de estresse, como mudança na temperatura,



presença de certos corantes ou carência de certos nutrientes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

De acordo com Molina-Aja e colaboradores (2002), a presença de plasmídios ou seu relacionamento com resistência a antibióticos, não foram notificadas a partir de estirpes bacterianas isoladas de culturas de peneídeos nas Américas.

Muitos tipos diferentes de antibióticos têm sido utilizados como agentes preventivos e terapêuticos em cultivos aquáticos. Dado que os produtos da aquicultura são consumidos por seres humanos e que a característica de resistência aos antibióticos podem ser transferida por elementos genéticos, animais marinhos cultivados podem servir como veículos de transmissão da resistência aos antibióticos de bactérias que são comensais ou mesmo patogênicas para os seres humanos (DANG et al., 2006).

Com poucas exceções, os antibióticos aplicados atualmente na aquicultura não foram desenvolvidos especificamente para este fim, o Continente Asiático, em especial a região Sudeste é responsável por elevada produção de camarões cultivados e tem sido relatado freqüentemente como usuário de antibióticos na aquicultura, sobretudo a oxitetraciclina (NOGUEIRA-LIMA, 2004).

Segundo Roque et al. (2001) a forma mais comum de se tratar o problema das vibrioses nas fazendas de camarão mexicanas é a adição de antibióticos tais como oxitetraciclina, florfenicol, ormethopim-sulfametoxazol, sarafloxacina e enrofloxacina na alimentação dos animais.

Nos tratamentos de organismos aquáticos, uma estirpe bacteriana pode ser resistente ou sensível, dependendo de alguns fatores adicionais tais como: a forma como o antibiótico é administrado, a distribuição do antibiótico em comparação com a localização do patógeno no indivíduo, bem como os fatores físico-químicos do ambiente. Um exemplo da influência do ambiente é o fato já conhecido de que a presença dos íons de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  no ambiente marinho reduzem a atividade biológica de oxitetraciclina, quinolonas, flumequina e ácido oxolinico (FAO, 2005).

Uma vez que o camarão *Litopenaeus vannamei* possui como habitat natural ambientes de águas salgadas e seu cultivo se dá em lugares próximos a estuários (águas salobras) a bioatividade do antibiótico utilizado no cultivo deve ser conhecido.

Já foi confirmado que a longevidade da oxitetraciclina no ambiente marinho é significativamente mediada pela sua capacidade de formar complexos com o magnésio e cálcio resultando em apenas cerca de 5% encontrado em uma forma antibacteriana ativa (LUNESTAD; GOKSOYR, 1990). A eficiência contra espécies de

*Vibrio*, entre os quais se encontram os principais patógenos dos organismos cultivados, (LIGHTNER, 1993; WEIFEN et al., 2004), e também sua ação no tratamento do NHP são os principais incentivos para a escolha dessa droga entre os produtores.

Desta forma, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os isolados resistentes a oxitetraciclina foi testada comparando os resultados com dois caldos de enriquecimento preparados com adição de 1% de NaCl (Caldo 1) e com água do mar (10ppm) (Caldo 2), seus valores estão ilustrados na Tabela 11.

**TABELA 11** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxitetraciclina para as cepas de *Vibrio* isoladas a partir de amostras de água de viveiro e hepatopâncreas de camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*).

Bactéria		Origem	Oxitetraciclina (mg/L)	
			Caldo 1	Caldo 2
AV57	<i>V. marinus</i>	Rio Coreaú	436 – 438	438 – 440
AV61	<i>V. tubiashii</i>	Rio Coreaú	434 – 436	434 – 436
AV86*	<i>V. mimicus</i>	Rio Jaguaribe	696 – 698	690 – 692
HP78	<i>V. mediterranei</i>	Rio Jaguaribe	434 – 436	438 – 440
HP123	<i>V. alginolitycus</i>	Rio Acaraú	78 – 80	70 – 72

\* sub-população resistente à oxitetraciclina (30 µg) pelo teste de disco-difusão; AV = água de viveiro; HP = hepatopâncreas; Caldo 1 = Mueller Hinton preparado com adição de 1% de NaCl; Caldo 2 = Mueller Hinton preparado com água do mar 10ppm.

Não foi observada neste experimento uma influência mais significativa da água do mar sobre a bioatividade do agente antimicrobiano, isso pode ter sido devido a baixa concentração de sais no meio.

A média da concentração inibitória mínima foi obtida para o antibiótico mais empregado na aqüicultura (oxitetraciclina), apresentando os menores valores de CIM para o isolado HP123, identificado como sendo *V. alginolitycus*, com valor de CIM 79 mg/L para o caldo 1 e 71mg/L para o caldo 2.

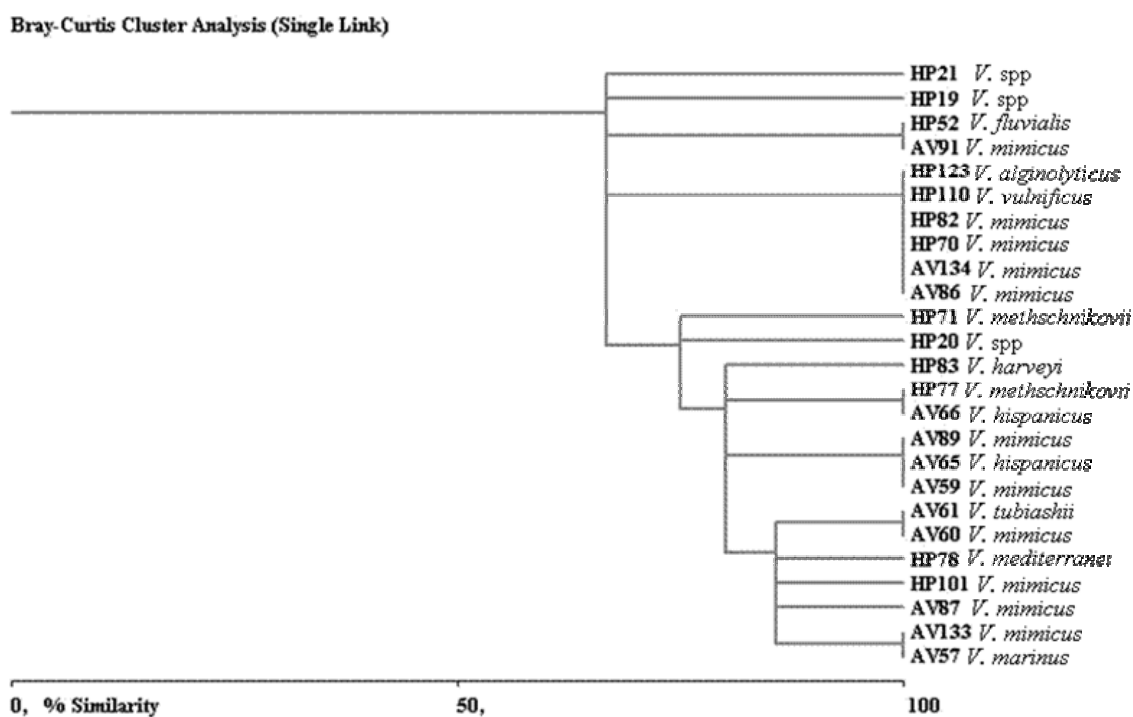
Os víbrios isolados por Mendes et al. (2001) a partir de cepas oriundas de larviculturas de *Litopenaeus vannamei* foram desafiados com a oxitetraciclina em diluições seriadas variando entre 5 e 50 ppm (mg/L) com intervalos de 5 ppm para determinação da CIM. Encontrando valores de sensibilidade variados e superiores a 5 mg/L.

Resultados semelhantes de CIM foram obtidos para os víbrios AV57 (437mg/L e 439mg/L), AV61 (435 mg/L) e HP78 (435 e 439mg/L) e o maior valor encontrado foi obtido para *Vibrio mimicus*, isolado do Rio Jaguaribe, com valores médios de 697 mg/L e 691 mg/L para caldo 1 e 2 respectivamente.

Pereira Júnior et al. (2006) avaliando o perfil de sensibilidade de cepas de *Aeromonas hydrophila* oriundas de pescados de diferentes localidades de cultivo encontraram resistência a oxitetraciclina com valores de CIM entre 100 a 800 mg/L. Sendo que a frequência maior de resistência foi proveniente de cultivos com histórico de uso deste antimicrobiano como controle e profilaxia de doenças bacterianas nos peixes.

A média da concentração inibitória mínima (CIM) para os antibióticos comumente usados na aquicultura do México foi determinada por Roque et al. (2001) ao analisar o perfil de susceptibilidade de cepas de vibrio isoladas de camarão cultivado, encontrando para oxitetraciclina o valor de CIM 304 mg/L.

Quando observamos o dendrograma elaborado baseado nas características fenotípicas de resistência aos antibióticos (Figura 12), pudemos verificar que o agrupamento dos isolados foi independente da origem, de espécie e de fonte (água de viveiro ou hepatopâncreas). A presença ou não de plasmídios também não foi fator determinante no que diz respeito a similaridade entre as bactérias com resistência a antibióticos.



**FIGURA 12** – Dendrograma de similaridade fenotípica baseado nos perfis de resistência aos antimicrobianos.

De acordo com o dendrograma observamos a presença de 6 agrupamentos de espécies de *Vibrio* com cem por cento de similaridade entre si: HP52 e AV91 (resistentes a OTC), HP123; HP110; HP82; HP70; AV134 e AV86 (resistentes a AMP), HP77, AV66 (resistentes a AMP e FOX), AV89, AV65 e AV59 (AMP e OTC), AV61 e AV60 (AMP, OTC e ATM) e AV133, AV57 (AMP, FOX,OTC e TET).

Devido à ocorrência de doenças nas fazendas de camarões e à inquietante manifestação de resistência bacteriana, a administração da alimentação à base de antibióticos requer uma investigação mais aprofundada. Sem dúvida, o desenvolvimento de doses terapêuticas ótimas iria minimizar os potenciais impactos sobre o ambiente natural e a saúde humana (NOGUEIRA-LIMA et al., 2006).

Segundo Tendência e Peña (2001) os antibióticos são administrados em fazendas de camarão primariamente para prevenir ou tratar doenças bacterianas. O uso indiscriminado de antimicrobianos requer estudos que permitam uma melhor compreensão do impacto destes compostos sobre a microbiota do ambiente e da cultura de camarões.

A utilização indiscriminada de drogas antimicrobianas de uso nos casos de clínica humana merece especial atenção, devido ao surgimento de patógenos resistentes a medicamentos.

Esta resistência vem sendo causada por diversos fatores, principalmente pelo lançamento de esgoto doméstico e industrial, inclusive da área farmacêutica, diretamente no ecossistema aquático, pela deposição de quimioterápicos no lixo comum e também pelo uso indiscriminado de antibióticos, seja pela administração de doses subterapêuticas ou sua utilização como promotores de crescimento na produção animal (PEREIRA, 2003).

Os efeitos da resistência antimicrobiana para o ecossistema aquático estrutura e função permanecem desconhecidas, mas a implicação da resistência generalizada para a saúde humana é preocupante (CRANE et al., 2006).

A maioria dos aqüicultores faz uso profilático de antibióticos e muitos deles não têm informações sobre as práticas de aplicação eficiente e segura desses medicamentos. É provável que a divulgação de informações sobre os efeitos positivos da utilização mais restrita desses antibióticos possa vir a contribuir para uma diminuição do emprego dessas substâncias nos cultivos e conseqüentemente reduzindo os impactos regionais sem afetar o nível de produção de camarões (HOLMSTROM et al., 2003).

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

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitiram chegar às seguintes conclusões:

- ✓ A maioria (80,64%) das estirpes de *Vibrio* sp. isoladas dos ambientes com atividade de carcinicultura apresentou resistência a pelo menos um dos antibióticos testados, alguns dos quais são drogas utilizadas na clínica humana;
- ✓ Um percentual significativo (44%) dentro das cepas resistentes apresentou perfil de multi-resistência, o que caracteriza um risco maior para a saúde humana e de animais;
- ✓ Pode-se verificar que essa característica de multi-resistência apresentada pelos isolados estava, em sua grande maioria (81,8%), relacionada à existência de plasmídios de resistência nas células bacterianas. A confirmação da presença desses plasmídios-R nos isolados representa um perigo para a disseminação dos genes de resistência, o que pode diminuir a eficácia dos antimicrobianos usuais no tratamento de infecções bacterianas.
- ✓ A origem dos isolados quanto ao tipo de amostra e estuário não influenciou o perfil qualitativo de resistência aos antibióticos.

Existem poucas informações disponíveis sobre a resistência bacteriana em áreas de cultivo de organismos aquáticos no Brasil. Esse fato dificultou a comparação dos dados encontrados em nossa pesquisa. O incentivo a pesquisa e o monitoramento dos perfis de resistência nas áreas de cultivo seriam de suma importância para o controle e gerenciamento do uso dessas drogas nos cultivos significando um fator positivo para a Saúde Pública, a segurança alimentar e da própria atividade agroindustrial.

Fazem-se necessários estudos complementares que visem demonstrar de que maneira esses microrganismo portadores de resistência a antimicrobianos podem afetar a incidência e/ou a gravidade de infecções nos organismos aquáticos cultivados e sua influência para a saúde humana e seu tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC – **Associação Brasileira de Criadores de Camarão** 2007. Disponível em: <[www.abccam.com.br](http://www.abccam.com.br)> Acesso em 12 ago. 2007.

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Camarões marinhos gestão de qualidade na fazenda: manual do pequeno produtor**. Recife-Pe, 51 p., janeiro 2005.

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Relatório preliminar da evolução da NIM nas fazendas de camarão da região Nordeste**. Recife-Pe, 26 p., 2004.

AGUIRRE-GUSMÁN, G. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in disease of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, 35, p. 1395-1404, 2004.

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

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

ALSINA, M.; BLANCH, A. R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 79-85, jan., 1994.

ALVES, C. S.; MELLO, G. L. **Manual para o monitoramento hidrobiológico em fazendas de cultivo de camarão**. Federação de Agricultura do Estado de Pernambuco – FAEPE, Comissão estadual da carcinicultura – COMCARCI, Serviço de apoio às micros e pequenas empresas em Pernambuco – SEBRAE/PE. Recife, 2007.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica – 4ª edição**. São Paulo, Editora Roca, 283p., 1994.

ANDRADE, A. N. Mitos e verdades sobre o uso de antibióticos nas rações. **Jornal CRMV RJ**. Ano XXI, nº 186, p. 4-5, Janeiro de 2007.

AVIB – **Association of Vibrio biologists** 2007. Disponível em: <[www.vibriobiology.net](http://www.vibriobiology.net)> Acesso em: 23 dez. 2007.

BARRACO, M. A. M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **Sanidade de organismos aquáticos**. Organizadores: Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de los Angeles Peres Lizama. Livraria Varela, p. 51-74, 2004.

BAUMANN, P.; SCHUBERT, R. H.W. Family II. *Vibrionaceae*. Vernon 1965. In Krieg N.R.; Holt, J. G. (eds): **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol I, p. 516-550, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOCKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSENBERG, E. *Vibrio corallitycus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pollicopora damicornis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, p. 309-315, 2003.

BIOMÉRIEUX ESPANHA. Productos – Sistema automático de identificación. Disponível em: <[http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN\\_IND\\_PRD&doc=SPN\\_IND\\_PRD\\_G\\_PRD\\_8](http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN_IND_PRD&doc=SPN_IND_PRD_G_PRD_8)> Acesso em: 20 jan. 2008.

BLAKE, P. A.; MERSON, M. H.; WEAVER, R.E. Diseases caused by a marine *Vibrio*: clinical characteristics and epidemiology. **New England Journal of Medicine**., 300, p. 1-5, 1979.

BRAYTON, P. R.; BODE, R. B.; COWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; HALL, H. L.; GRIMES, D. J.; WEST, P. A.; BRYANT, T. N. *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**. 23, nº 1, p. 104-108, jan. 1986.

BRENNER, D. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; LEE, J. V.; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R.; HOLLIS, D. G.; FARMER III, J. J.; WEAVER, R. E.; JOSEPH, S. W.; SEIDLER, R. J. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**. 18, nº 4, p. 816-824, 1983.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 59, nº.4, p.869-876, 2007.

CARVALHO, R. A. P. L. F.; RUIVO, U. E.; ROCHA, I. P. Mercado Interno: Situação e oportunidades para o camarão brasileiro. **Revista Panorama da Aqüicultura**, p. 22-31, maio/Junho 2007.

CEFAR. Resistência bacteriana. **Cefar em notícia: Informativo Cefar de Microbiologia**. Ano III, Ed. 19, jan./fev. 2006.

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

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**. 367, p. 23-41, 2006.



COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Instituto de Ciências do Mar) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2006.

DANG, H.; ZHANG, X.; SONG, L.; CHANG, Y.; YANG, G. Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters of China. **Marine Pollution Bulletin.** 52, p. 1494-1503, 2006.

DAVIS, B. R.; FANNING, J. M.; MADDEN, A. G.; STEIGERWALT, H. B.; BRADFORD JR, H. L.; SMITH, JR.; BRENNER, D. J. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **Journal of Clinical Microbiology.** Vol. 14, p. 631-639, 1981.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. P. Probióticos como alternativa anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, ano 7, nº 4, p.58-59, Dezembro de 2005.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, ano 8, nº 2, p.40-41, Junho de 2006.

DENNER, E. B. M.; VYBIRAL, D.; FISCHER, U. R.; VELIMIROV, B.; BUSSE, H. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0,2 µm – filterable marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 52, p. 549-553, 2002.

DESMARCHELIER, P. M.; REICHELI, L. L. A phenotypic and genetic study of sucrose nonfermenting strains of *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae*. **Current Microbiology.** 10, p. 41-48, 1984.

DÍAZ, R. A. J.; PITA, M. T. S.; ALEMÁN, Z. W.; RUBALCABA, S. C.; GONZÁLEZ, M. I. G.; ROSA, O. E. D.; SALAZAR, M. C. R. Sensibilidade antimicrobiana em bactérias de origem ambiental. **Revista Higiene y Sanidad Ambiental**, nº 6; p 150-159, 2006.

EGUCHI, M.; FUJIWARA, E.; MIYAMOTO, N. Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation?. **Journal of Infection and Chemotherapy.** 6, nº 2, p. 126-129, 2000.

EL-FAR, F.; RICHTMANN, R. INFECTOLOGIA - PREVENIR É A MELHOR OPÇÃO: A LUTA CONTRA OS GRAM-POSITIVOS MULTIRESISTENTES. **Revista Prática Hospitalar.** Ano III, nº 13, p. 7-9, jan./fev. 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Responsible use of antibiotics in aquaculture.** Roma, paper 469, 110p., 2005.

FAO/OIE/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations/ International Office of Epizootics/ World Health Organization. **Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance**. Seoul, Republic of Korea, 97p., junho 2006.

FAURY, N.; SAULNIER, D.; THOMPSON, F. L.; GAY, M.; SWINGS, J. LE ROX, F. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54, p. 2137-2140, 2004.

FRELIER, P. F.; LOY, J. K. REDDINGTON, J. Diferenciação no campo e em laboratório do NHP e da vibriose. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, ano 6, nº 3, p.55 – 56, set. 2004.

FUCHS, F. D. WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica – Fundamentos da terapêutica racional – 2ª edição**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 678p., 1999.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; SWINGS, J. *Vibrio pacinii* sp. nov., from cultured aquatic organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, p. 1569-1573, 2003a.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; GARCIA-GASCA, A.; ROQUE, A.; SWINGS, J. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54, p. 261-265, 2004b.

HICKMAN, F. W.; FARMER III, J. J.; HOLLIS, D. G.; FANNING, G. R.; STEIGERWALT, A. G.; WEAVER, R. E.; BRENNER, D. J. Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from Patients with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**. 15, nº3, p. 395-401, março 1982.

HOLMSTROM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTRON, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N.; Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**. 38, p. 255-266, 2003.

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. **FAO Documento Técnico sobre as Pescas**. nº 334. Roma, FAO. 176p., 1997.

IIDA, T.; HATTORI, A.; TAGOMORI, K.; NASU, H.; NAIM, R.; HONDA, T. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Emerging Infectious Diseases**. 7, nº 3, p. 477 – 478, Maio/Junho de 2001.

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (Índia). **Journal of the World Aquaculture Society**. 37, p. 523-532, 2006.

KIM, S-R; NONAKA, L.; SUZUKI, S. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet*(M) and *tet*(S) in bacteria from marine aquaculture sites. **FEMS Microbiology Letters**. 237, p.147–156, 2004.

KIM, S-R; NONAKA, L.; OH, M-J.; LAVILLA-PITOGO, C. L. SUZUKI, S. Distribution of an oxytetracycline resistance determinante *tet* (34) among marine bacterial isolates of a *Vibrio* species. **Microbes and Environments**. 18, nº 2, p. 74-81, 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, C. WINN, JR. W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido – 5ª edição**. Editora Guanabara Koogan S.A. 1465p. 2001.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**. 46, nº 1, p. 165-170, julho, 1983.

LABORCLIN. **Manual para antibiograma – Técnica de difusão por disco**. 20p. maio de 2007.

LE ROX, F.; GOUBET, A.; THOMPSON, F. L.; FAURY, N.; GAY, M.; SWINGS, J.; SAULNIER, D. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 55, p. 2251-2255, 2005.

LEE, J. V.; SHREAD, P.; FURNISS, A. L. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F vibrios, group EF6). **Journal of Applied Bacteriology**. 50, p.73-94., 1981.

LEVY, C. E. Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica. In: **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Editora Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), módulo 3, 45 p., 2004.

LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp, In: McVey, J.P. (Ed.), **CRC Handbook of Mariculture**, Volume I: Crustacean Aquaculture, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, FL, US, p. 393–486, 1993

LIMA, A. S. ***Vibrio* em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Ceará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Instituto de Ciências do Mar – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICOLLI, R. H.; BUENO FILHO, J. S. S.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras. 30, nº 1, p. 126-132, janeiro/fevereiro, 2006.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases**. 36 (Supl 1), p.11-23, jan. 2003.

LOVE, M., D.; TEEBKEN-FISHER, J. E.; HOSE, J. J.; FARMER III,; F. W. HICKMAN; FANNING, G. R. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. **Science**. 214, p.1139–1140, 1981.

LUNESTAD, B.T., GOKSOYR, J. Reduction in the bacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. **Disease of Aquatic Organisms**. 9, 67–72, 1990.

MACALEECE N.; LAMBSHEAD P.J.D.; PATERSON G.L.J.; CAGE J.D. Biodiversity Pro (V.3.0). **Natural History Museum and Scottish Association for Marine Science**. 1997. Disponível em: <<http://www.sams.ac.uk/dml/projects/benthic/bdpro>>. Acessado em: 13/01/2007.

MACIÁN, M. C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; PUJALTE, M. J.; GARAY, E. *Vibrio agarivorans* sp. nov. agarolytic marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 51, p. 2031-2036, 2001.

MAIA, E. P. Impactos ambientais na aqüicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, ano 7, nº 2, p.69-72, Junho de 2005.

MANJUSHA, S.; SARITA, G.B.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. 1, nº 4, p. 201 – 206, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>> Acesso em 02 dez. 2007.

MATTÉ, M. H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M. L.; MALUCELLI, M. I. C.; NITRINI, S. M. O. O.; MATTÉ, G. R. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control**. 18, p. 747 – 751, 2007.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**. 10, nº 2, p. 483-491, 2005.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **The Science of the Total Environment**. 293, p. 207-218, 2002.

MENDES, E. S.; ALVES, C. A. B.; BEZERRA, S. S.; MENDES, P. P.; SANTOS, R. L. Sensibilidade *in vitro* à enrofloxacin e oxitetraciclina de *Vibrio* isolados na larvicultura de

camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). **Ciência Veterinária Tropical**. Recife – Pe. 7, nº 2 e 3, p. 90-97, maio/dez. 2004.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. Bacterial genetics: DNA exchange, recombinação, mutagênese e reparo. **Microbial Physiology**. 4<sup>th</sup> ed., 714 p. 2002.

MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLÁN-MEJÍA, C. ROQUE, A. GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**. nº 213, p. 7-12, 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica – 4ª edição**. Editora Guanabara Koogan. 762p. 2004.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eight Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Sixth Edition**. NCCLS document M7 – A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

NOGUEIRA-LIMA, A. C. **Residualidade da oxitetraciclina no tecido do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustácea decápoda) submetido a tratamento antibiótico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Instituto de Ciências do Mar – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2004.

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

NUNES, A.J.P; GESTEIRA, T.C.V; OLIVEIRA, G.G; LIMA, R.C.; MIRANDA, P.T.C.; MADRID, R.M. Princípios para boas práticas de manejo (BPF) na engorda de camarão marinho no Estado do Ceará. **Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC)**. Programa de Zoneamento Ecológico Exclusivo (ZEE) do Estado do Ceará, Fortaleza. Ceará. 109p. 2005.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aqüicultura**. 12, nº 72, p. 23 – 33, Julho/Agosto 2002.

NWOSU, V. C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Research of Microbiology**. 152, p. 421 – 430, 2001.

OLIVEIRA, C. G. **Regulação gênica da biossíntese de Violaceína e *Quorum sensing* em *Chromobacterium violaceum***. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina. 159p., 2005.

OMS. **Estratégia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos**. 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/en/execsums.pdf>> Acesso em 17 out. 2007.

OPAS/ANVISA/SVS – Organização Pan-Americana da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **Termo de Cooperação nº 37 – Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos**. 58p., 2006.

PAIVA ROCHA, I; MAIA ROCHA, D. Carcinicultura: Produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, ano. 9, nº 1, p. 16-22, Setembro de 2007.

PEREIRA, C. S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a saúde pública – Contexto político-social e microbiológico**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública). Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 2003.

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

RAGUÉNÈS, G.; CHRISTEN, R.; GUEZENNEC, J.; PIGNET, P.; BARBIER, G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 47, nº 4, p. 989-995, 1997.

REED, L.; SIEWICKI, T.; SHAH, J. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture**. 232, p. 11-28, 2004.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, C. GOMEZ-GIL, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **International Journal of Antimicrobials Agents**. 17, p. 383-387, 2001.

SARTER, S.; NGUYEN, H. N.K.; HUNG, L.T.; LAZARD, J.; MONTET, D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. **Food control**. 18, p. 1391-1396, 2007.

SAAVEDRA, M. J.; BRITO, R. D.; SOUSA, M.; ALVES, A.; REMA, P. Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Susceptibilidade a diferentes grupos de antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 56, nº 2, p. 277 – 279, 2004.

SHAKILA R. J.; VYLA, S. A. P.; KUMAR, R.S.; JEYASEKARAM, G.; JASMINE, I. Stability of chloramphenicol residues in shrimp subjected to heat processing treatments. **Food Microbiology**. 23, p. 47-51, 2006.

SHIEH, W. Y.; CHENT, A.; CHIU, H. *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gas production. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50, p. 321-329, 2000.

SHINOZAKI MENDES, E.; PAULA MENDES, P.; GÓES, L. M. N. B.; VIEIRA, K. P. B. A. Os vibrios na carcinicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**. 15, nº 91, p. 26 – 29, Setembro/Outubro, 2005.

SIGEE, D. C. Freshwater Microbiology: biodiversity e dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. **John Wiley & Sons Ltda**, 524 p., 2005.

STARKS, A. M.; SCHOEB, T. R.; TAMPLIN, M. L.; PARVEEN, S.; DOYLE, T. J.; BOMEISL, P. E.; ESCUDERO, G. M.; GULIG, P. A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. **Infection and Immunity**. Vol. 68, nº 10, p. 5785-5793, outubro de 2000.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Trad. Ane Rose Bolner... (et al.). – Porto Alegre: Artmed, 531 p., 2004.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos – 2ª edição**. São Paulo: Editora Atheneu, 792p., 1996.

TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. **Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds**. *Aquaculture*. 195, p. 193-204, 2001.

TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**. 213, p. 1-13, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª edição - Revisada e atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 718 p., 2005.

THOMPSON, F. L.; LI, Y.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C. C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; RUPP, G. S.; PEREIRA, A.; DE BEM, M. M.; SOGERLOO, P.; SWINGS, J. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov., and *Vibrio xuii* sp. nov. isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, p. 245-252, 2003a.

THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; LI, Y.; GOMEZ-GIL, B.; HOSTE, B.; VANDERBENGHE, J.; SWINGS, J. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov., *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, p. 753-759, 2003b.

THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; GULLIAN, M.; SWINGS, J. *Vibrio fortis* sp. nov., and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from

aquatic animals and the marine environment. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, p. 1495-1501, 2003c.

THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 53, p.1615–1617, 2003d.

UNIFESP/ LEM – **Laboratório Especial de Microbiologia Clínica**. Disponível em: <[www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/caso01.htm](http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/caso01.htm)> Acesso: em 20 jan. 2007.

WANG, L.; YANG, H.; ZHANG, C.; MO, Y.; LU, X. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. doi:10.1016/j.aca.2008.01.026, 2007.

WEIFEN, W., HONG, L., CHANGHU, X., JAMIL, K. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. **Environment International**. 30, p. 367–373, 2004.

WHO. World Health Organization. **Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans**. Fact sheet nº 268. jan 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/factsheets/fs268/en/print.html>> Acesso em: 14 ago. 2007.

ZANOLO, R. Enfermidades na aquicultura: perspectivas e importância do uso de produtos veterinários registrados para a atividade. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, 8, nº 2, p. 42-44, Junho de 2006.



## 8. ANEXO – Preparação de reagentes e meios de cultura.

### 1. Preparo do corante cristal violeta (2%) (Coloração de Gram)

-Solução A: Cristal violeta (85% puro)-----2,0 g  
                  Álcool Etilico (95%)-----20 mL

-Solução B: Oxalato de amônio-----0,8 g  
                  Água destilada-----80 mL

Misturar as soluções A e B.

### 2. Preparo do corante Lugol (Coloração de Gram)

- Iodo cristalizado-----1,0 g  
- Iodeto de potássio-----2,0 g  
- Água destilada-----300 mL

### 3. Preparo do corante safranina (0,25 %) (Coloração de Gram)

- Safranina (2,5% em álcool a 96%)-----10 mL  
- Água destilada-----100mL

### 4. Preparo da solução de McFarland 0,5

Foram adicionados 0,5mL de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 48mM em 99,5mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,36N. Estocagem em vidro escuro.

### 5. Solução salina a 0,85%

Suspensão de 0,85g de NaCl em 100mL de água destilada. Distribuição de 9mL nos tubos de ensaio. Autoclavação a 121°C por 15 minutos.

### 6. Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS)

De acordo com as recomendações do fabricante, foram dissolvidos por aquecimento, 89,0 gramas do meio desidratado em 1000mL de água destilada. O meio foi fervido até sua total dissolução. Em seguida, distribuído, ainda quente, em volumes de 15 mL, aproximadamente, em placas de Petri esterilizadas e após sua solidificação, as placas foram utilizadas. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

### 7. Ágar Triptona Soja (TSA) com 1% de NaCl

- Ágar TSA-----40g
- Cloreto de sódio-----1,0g
- Água destilada-----100mL

À água destilada foram adicionados os ingredientes que eram misturados e a solução fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio, de forma a se ter uma base de aproximadamente 2 cm de altura e uma parte inclinada. Após a solidificação do meio, eram mantidos em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

### 8. Caldo Triptona Soja (TSB) com 1% de NaCl

- Caldo triptona-soja (TSB-DIFCO)-----30,0 g
- Cloreto de sódio-----1,0 g
- Água destilada-----1000 mL

À água destilada foram adicionados os ingredientes e em seguida, quando necessário. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

### 9. Caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 1% de NaCl

- Caldo BHI (DIFCO)-----37 g
- Cloreto de sódio-----1,0 g
- Água destilada-----1000 mL

À água destilada foram adicionados os ingredientes e em seguida, quando necessário. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

**10. Caldo Luria Bertani – LB**

Triptona-----	10g
Extrato de carne-----	5,0g
Cloreto de Sódio-----	10g
Ágar-----	15g

À água destilada foram adicionados os ingredientes que eram misturados e a solução fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

**11. Ágar Mueller-Hinton com 1% de NaCl**

- Ágar Mueller Hinton-----	28g
- Cloreto de Sódio-----	1,0g
- Água destilada-----	1000mL

Os ingredientes foram misturados e agitados por aproximadamente 1 minuto. Em seguida o meio foi aquecido até a sua completa dissolução e levado à esterilização por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Distribuição de 15mL por placas de Petri estéril. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

**12. Caldo Mueller-Hinton com 1% de NaCl**

- Caldo Mueller Hinton (Difco)-----	21g
- Cloreto de sódio-----	1,0 g
- Água destilada-----	1000 mL

Os ingredientes foram misturados por aproximadamente 1 minuto para completa dissolução do pó. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

**13. Caldo Mueller-Hinton com água do mar 10ppm**

- Caldo Mueller Hinton (Difco)-----21g

- Água do mar (10ppm)-----1000 mL

Os ingredientes foram misturados por aproximadamente 1 minuto para completa dissolução do pó. O meio foi distribuído em porções de 5,0 mL em tubos de ensaio 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)