

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO AGROPECUÁRIA**

TESE

**Utilização de Marcadores Fenogenotípicos de
Virulência na Caracterização de *Vibrio* spp. Isolados
a partir de Mexilhões (*Perna perna*) em Diferentes
Pontos do Litoral do Rio de Janeiro**

Marcelo Santos de Oliva

2012



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES FENOGENOTÍPICOS DE
VIRULÊNCIA NA CARACTERIZAÇÃO DE *VIBRIO* SPP. ISOLADOS A
PARTIR DE MEXILHÕES (*PERNA PERNA*) EM DIFERENTES
PONTOS DO LITORAL DO RIO DE JANEIRO**

MARCELO SANTOS DE OLIVA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação das Professoras
Shana de Mattos de Oliveira Coelho e

Maria Claudia Rodriguez

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ
Novembro de 2012

639.42

O48u

T

Oliva, Marcelo Santos de, 1970-

Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (Perna perna) em diferentes pontos do litoral do Rio de Janeiro / Marcelo Santos de Oliva – 2012.

82 f.: il.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.

Bibliografia: f. 56-82.

1. Mexilhão – Teses. 2. Mexilhão – Microbiologia - Teses. 3. Aeromonas – Teses. 4. Água do mar - Análise – Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 5. Microbiologia marinha – Teses. 6. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

MARCELO SANTOS DE OLIVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 30/11/2012

Miliane Moreira Soares de Souza. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Dália dos Prazeres Rodrigues. Dr. Fiocruz

Fernando Julio Ibañez. Dr. UNRC

Fábio Vieira de Araújo. Dr. UERJ

Douglas McIntosh. Dr. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo, a quem atribuo toda minha força, sabedoria e vida. Obrigado por me proteger e conduzir por caminhos seguros. Eu te amo meu Deus.

A minha família. Aos meus pais por serem meu porto seguro, a razão da minha vida. Todos os dias agradeço a Deus por ter pais maravilhosos. Tenho honra de tê-los com meus pais. Eles são exemplos de dedicação, honestidade e de amor. Agradeço a eles por tudo o que sou. Obrigado pelo incentivo, força e compreensão. Amo os senhores.

Aos meus irmãos pelo amor de vocês, o companheirismo, incentivo e dedicação nos momentos difíceis da minha vida. Amo vocês.

Ao amigo Bruno Rocha Pribul por sua contribuição ao desenvolvimento desta tese, por sua dedicação, ajuda e compromisso com as coletas. Pelo seu empenho em coletar os mexilhões em situações de difícil acesso.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia que me auxiliaram no desenvolvimento da minha tese e em especial a Greice, Cássia, Ana, Gabrielle, Bruno (Salgado) e Dayane, por momentos mágicos e engraçados que jamais irei esquecer. Muito obrigado por tudo. Obrigado também a todos aqueles que passaram pelo laboratório.

Aos amigos estagiários do Laboratório de Bacteriologia, que foram fundamentais para a execução e desenvolvimento desta tese: Pedro, Felipe (Gaúcho), Tiago, Naiara, Marcela, Marisol, Ana Carolina, Juliana e aos demais que entram recentemente ao laboratório.

A Empresa Serviços Marítimos Continental S.A. e em especial ao Srº Afonso, Miro e Celso pelo apoio logístico e estrutural para realização das coletas. Sem esta contribuição seria difícil a realização desta pesquisa.

A prefeitura de Angra dos Reis pela ajuda e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Srº André e o Srº Waldemar por permitir a a coleta dos mexilhões nas fazendas de maricultura.

Ao Srº Luciano pela permissão e acesso a fazenda de maricultura em Arraial do Cabo que foi de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Marco Antonio Soares de Souza por ter sido a pessoa responsável pela realização desta etapa da minha vida. Quando estávamos embarcados conversamos sobre a possibilidade de realizar um curso de Pós-Graduação. Obrigado por ter acreditado em mim e ter proporcionado esta experiência inesquecível. Tenho um grande orgulho de ser seu amigo. Obrigado por sua contribuição no desenvolvimento desta tese, na elaboração e na coordenação dos mergulhos realizados para coleta das amostras, pois foram indispensáveis para o sucesso das coletas.

Ao amigo Gerson de Lima por sua amizade, dedicação, palavras de força e otimismo nos momentos difíceis e por sua contribuição para desenvolvimento do trabalho realizado.

Ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo apoio financeiro e logístico para realização da pesquisa realizada. Sem sua contribuição esta pesquisa não teria sido realizada com sucesso.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, da UFRRJ, e a todos os seus professores.

A minha orientadora Miliane Moreira Soares de Souza pela oportunidade, credibilidade, confiança e pela contribuição em meu crescimento profissional e pessoal, onde encontrei sempre palavras de apoio, conforto e incentivo. Obrigado por tudo o que você fez e faz em minha vida. Obrigado por ter acreditado em mim e ter proporcionado esta experiência inesquecível, por ter aberto novos horizontes. Agradeço a você a chance de ter conhecido pessoas maravilhosas que fizeram uma grande transformação em minha vida profissional e pessoal.

A minha co-orientadora Professora Shana de Mattos de Oliveira Coelho por sua amizade, dedicação, atenção e incentivo que foram fundamentais para desenvolvimento da minha tese. Muito obrigado por tudo.

A minha co-orientadora Maria Claudia Rodríguez por toda atenção e incentivo quando estive em Río Cúarto, na Argentina.

A Professora Irene Coelho por sua tranquilidade, dedicação, sabedoria, incentivo e contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por estar sempre pronta a ajudar em todos os momentos de dificuldades. Meus sinceros agradecimentos a esta pessoa extremamente profissional, dedicada e especial. Muito obrigado por tudo.

E, finalmente, a pessoa que sempre me incentivou, ajudou com suas idéias fabulosas e sua sagacidade, que contribuiu de forma espetacular para execução da minha tese. Aturou meu mau humor sem reclamar, foi paciente, e nos momentos difíceis sempre disse palavras de carinho, conforto, apontando saídas, dando conselhos sábios e que puxou minha orelha nos momentos necessários. Esta pessoa sem sobra de dúvida somente Deus poderia colocar no meu caminho, Lidiane de Castro Soares, o meu eterno amor. Obrigado por tudo que você fez e faz em minha vida. Só tenho que agradecer a Deus por ter colocado você em minha vida.

RESUMO

OLIVA, Marcelo dos Santos. **Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) em diferentes pontos do litoral do Rio de Janeiro.** 2012. 82f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que se alimentam de micro-organismos captados pela corrente de água e não filtram seletivamente o alimento, refletindo a qualidade microbiológica do habitat aquático. O trabalho objetivou caracterizar espécies bacterianas de importância em Saúde Pública associadas aos bivalves incrustados em costões rochosos próximos a cabos subaquáticos no Arquipélago de Santana em Macaé e em fazendas de maricultura em Angra dos Reis, Baía da Ilha Grande e Arraial do Cabo, no Estado do Rio de Janeiro. Associado a isso, o trabalho visou detectar o perfil de resistência antimicrobiana dos isolados bacterianos e os genes marcadores e de virulência a partir de *Vibrio* spp. Foi feita a caracterização pela detecção de gene alvo (*rpoA*) encontrado em todas as cepas de *Vibrio*, dos genes espécie específico (*tlh* e *cth*) e genes de virulência (*tdh*, *trh* e *cth*), e avaliada a água do mar quanto a possíveis contaminações decorrentes de atividades pesqueiras e subaquáticas. Foram feitas 7 coletas e obtidos 209 isolados de *Vibrio* spp., representados por *Vibrio parahaemolyticus* 40,66% (85/209), *Vibrio alginolyticus* 19,6% (41/209), *Vibrio vulnificus* 12,4% (26/209) e outras espécies 27,2% (57/209). Foram detectados 91,3% (191/209) de resistência à ampicilina, 23,9% (50/209) à ciprofloxacina, 18,6% (39/209) à nitrofurantoína, 5,7% (12/209) à tetraciclina, 4,3% (9/209) à pefloxacina e 3,3% (7/209) ao cloranfenicol. Todos os 209 isolados identificados fenotipicamente como *Vibrio* spp. amplificaram o gene *rpoA*, gerando fragmento de 242 pb. O gene *tlh* foi detectado em 40,6% (85/209) dos isolados de *Vibrio* spp., identificados como *V. parahaemolyticus*. Do total de 85 isolados de *Vibrio parahaemolyticus*, o gene *tdh* foi detectado em 68,2% (58/85) e o gene *trh* em nenhum isolado. O gene *cth* foi detectado em 12,5% (26/209) dos isolados, todos identificados fenotipicamente como *V. vulnificus*, amplificando um fragmento de 386 pb. A análise do sequenciamento genético em oito isolados de *Vibrio* spp. foi correlata com a identificação fenogenotípica em 50% (4/8). Nos isolados onde não foi estabelecida correlação (4/8) foram aplicados testes bioquímicos e identificação genotípica baseada em genes espécie-específicos. Em relação à detecção de enterobactérias, a partir das 7 coletas, foram obtidos 88 isolados, representados por 29,5% (26/88) de *Escherichia coli*, 10,2% (9/88) de *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*, 9,1% (8/88) de *Citrobacter diversus*, 7,9% (7/88) de *Enterobacter aerogenes*, 5,7% (5/88) de *Proteus vulgaris*, 4,5% (4/88) de *Serratia rubidae*, *Enterobacter sakazakii* e *Citrobacter freundii*, 3,4% (3/88) de *Hafnia alvei*, 2,3% (2/88) de *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* e *Yersinia enterocolitica* e 1,1% (1/88) de *Proteus mirabilis*. Foram detectados 64,7% (57/88) de resistência à ampicilina, 39,7% (35/88) à cefalotina, 30,7% (27/88) à gentamicina, 26,1% (23/88) à cefoxitina, 15,9% (14/88) à ceftriaxona e tetraciclina, 13,6% (12/88) ao cloranfenicol, 11,4% (10/88) à ciprofloxacina, 7,9% (7/88) à ampicilina-sulbactam e aztreonam e 1,1% (1/88) ao imipinem. A análise microbiológica da água do mar revelou a presença de coliformes termotolerantes em 50% (4/8) das amostras de Arraial do Cabo. Foram detectados 12 isolados de *Aeromonas* spp. A patogenicidade de algumas espécies bacterianas, aliada a resistência a antibióticos, torna importante a avaliação microbiológica dos mexilhões para monitorar estes organismos, para a segurança dos manipuladores e consumidores.

Palavras-chaves: *Aeromonas*. Coliformes. Mexilhões. Maricultura. Saúde pública. *Vibrio*.

ABSTRACT

OLIVA, Marcelo dos Santos. **Use of virulence fenotipic and genotipic markers in the characterization of *Vibrio* spp. isolated from mussels (*Perna perna*) from different parts of Rio de Janeiro coast.** 82p. Thesis (Doctor Science in Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Mussels are bivalve filtrating mollusks, which feed of microorganism uptaken from the water current, and it is not a selective mechanism, so mussels microbiological analysis shows up the aquatic environment quality. The objective of the study was to characterize the bacterial species of public health importance associated with bivalve mollusks incrustated in underwater cable and into the coastal rocks of Arquipélago de Santana, Macaé, and mariculture farms in Angra dos Reis of Ilha Grande and Arraial do Cabo, all in Rio de Janeiro State. Associated with this, the present study aimed to detect antimicrobial resistance profile of bacterial isolates and virulence markers and genes from *Vibrio* spp. Characterization was performed by detecting of target gene (*rpoA*), found in all strains of *Vibrio*, species specific genes (*tlh* and *cth*) and virulence genes (*tdh*, *trh* and *cth*). It was evaluated the water quality for possible contamination from fishing activities and underwater. Seven samples were taken and obtained a total of 209 strains of *Vibrio* spp., represented by *Vibrio parahaemolyticus* 40.66% (85/209), *Vibrio alginolyticus* 19.6% (41/209), *Vibrio vulnificus* 12.4% (26/209) and other species 27.2% (57/209). Was detected 91.3% (191/209) ampicillin resistance, 23.9% (50/209) to ciprofloxacin, 18.6% (39/209) to nitrofurantoin, 5.7% (12/209) to tetracycline, 4.3% (9/209) to pefloxacin and 3.3% (7/209) to chloramphenicol. All 209 isolates phenotypically identified as *Vibrio* spp. amplified *rpoA* gene, generating a fragment of 242 bp. The *tlh* gene was detected in 40.6% (85/209) of the isolated *Vibrio* spp., all phenotypically identified as *V. parahaemolyticus*. Among 85 strains of *Vibrio parahaemolyticus*, the *tdh* gene was detected in 68.2% (58/85), and the *trh* gene was not detected. The *cth* gene was detected in 12.5% (26/209) of isolates, all identified phenotypically as *V. vulnificus*, amplifying a fragment of 386 bp. The correlation between the fenotipic and genotypic identification of the *Vibrio* spp. strains with the sequencing data was obtained in 50% (4/8) of isolates. In isolates without correlation (4/8) biochemical assays and genotypic identification based on species-specific genes tests were applied to identify the isolates. The detection of *Enterobacteriaceae* achieved a total of 88 isolates, represented by 29.5% (26/88) of *Escherichia coli*, 10.2% (9/88) of *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter cloacae*, 9.1% (8/88) of *Citrobacter diversus*, 7.9% (7/88) of *Enterobacter aerogenes*, 5.7% (5/88) of *Proteus vulgaris*, 4.5% (4/88) of *Serratia rubidae*, *Enterobacter sakazakii* and *Citrobacter freundii*, 3.4% (3/88) of *Hafnia alvei*, 2.3% (2/88) of *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* and *Yersinia enterocolitica* and 1.1% (1/88) of *Proteus mirabilis*. Also, it was detected 64.7% (57/88) ampicillin resistance, 39.7% (35/88) to cephalothin, 30.7% (27/88) to gentamicin, 26.1% (23/88) to cefoxitin, 15.9% (14/88) to ceftriaxone and tetracycline, 13.6% (12/88) to chloramphenicol, 11.4% (10/88) to ciprofloxacin, 7.9% (7/88) to ampicillin and sulbactam, aztreonam, and 1.1% (1/88) to imipenem. Microbiological analysis of seawater revealed presence of coliforms in 50% (4/8) of samples from Arraial do Cabo. A total of 12 strains of *Aeromonas* spp. were detected. Due to intrinsic pathogenicity of some bacterial species, plus the antibiotics resistance, it is important the microbiological evaluation of mussels for their monitoring, ensuring the safety of handlers and consumers.

Key words: *Aeromonas*. Coliforms. Mussel. Mussel culture. Public health. *Vibrio*.

RESUMEN AMPLIADO

OLIVA, Marcelo dos Santos. **Uso de marcadores de virulencia fenogenotípicos en la caracterización de *Vibrio* spp. aislados de mejillones (*Perna perna*) en diferentes zonas de la costa de Río de Janeiro.** 82p. Tesis (Doctorado en Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

1 Introducción

Los mejillones son bivalvos filtradores que carecen de capacidad de filtración selectiva de los alimentos y retienen los microorganismos capturados por la corriente de agua, pudiendo representar un importante vehículo para la transmisión de bacterias patógenas (LIRA et al., 2001). La diversidad del medio ambiente marino está en peligro debido a la contaminación, la descarga de efluentes industriales y aguas de lastre de los barcos. Esto se torna un problema debido a que estas áreas están muchas veces destinadas al cultivo de mejillones, ocasionando un problema en la salud pública. La presencia de *Vibrio* spp. ha sido relacionada con manifestaciones intestinales y extraintestinales tales como infecciones de la piel o de heridas (PFEFFER et al., 2003). El interés en la realización de este estudio surgió de la necesidad de caracterizar la especie y la susceptibilidad a los antimicrobianos de las bacterias asociadas a los bivalvos, así como determinar su importancia para la salud pública debido a la ingestión de mariscos contaminados y la exposición de profesionales de la acuicultura durante el proceso de colecta de moluscos.

2 Material y Métodos

Se realizó un total de siete recolecciones de mejillones de la especie *Perna perna* en Macaé, Angra dos Reis y Arraial do Cabo, todos ubicados en el estado de Rio de Janeiro. Los mejillones fueron analizados en el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Para la detección de *Vibrio* spp. se adoptó la metodología recomendada por la FDA (1995), y la identificación de los microorganismos se realizó según la metodología propuesta por Koneman et al. (2008). La identificación de Enterobacterias y *Aeromonas* fue realizada según recomendaciones de Koneman et al. (2008). Después del aislamiento, se analizó el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de todas las cepas bacterianas según el CLSI (2007; 2011).

Los coliformes totales y fecales fueron enumerados por el método del Número Más Probable (NMP) de acuerdo con las recomendaciones establecidas por la Instrucción No. 62 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento - MAPA (BRASIL, 2003).

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Chapman et al. (2001). Los ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos en la literatura para la detección del gen *rpoA*, que se encuentra en todos los aislados de *Vibrio* spp. (DALMASSO et al., 2009), y genes especie específicos de *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*) (HONDA et al., 1993), genes de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh* y *trh*) (HONDA et al., 1993) y el gen especie específico de *Vibrio vulnificus* (*cth*) (BRAUN et al., 1991).

Los productos de amplificación fueron purificados usando Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio) según lo recomendado por el fabricante y secuenciados por la empresa Helixxa for Life (Campinas / SP). Las secuencias fueron editadas en el programa BioEdit

(HALL, 1999) y analizadas mediante el algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), lo que permite determinar la identidad de las secuencias de los microorganismos aislados por comparación con las secuencias de nucleótidos almacenadas en la base de datos NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias fueron importadas en el programa MEGA versión 4 (TAMURA et al., 2007), y alineadas utilizando el programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994). Los dendrogramas fueron construidos utilizando el algoritmo Neighbor joining (NJ) (KUMAR et al., 2004).

3 Resultados y Discusión

Un total de 209 cepas de *Vibrio* spp. fueron aisladas de las 7 muestras, representadas por *Vibrio parahaemolyticus* 40,66% (85/209), *Vibrio alginolyticus* 19,6% (41/209), *Vibrio vulnificus* 12,4% (26/209) y otras especies de *Vibrio* 27,2% (57/209). Se analizó el perfil de resistencia a antibióticos, siendo 91,3% de los aislamientos (191/209) resistente a la ampicilina, 23,9% (50/209) a la ciprofloxacina, 18,6% (39/209) a la nitrofurantoína, 5,7% (12/209) a la tetraciclina, 4,3% (9/209) a la perfloxacina y 3,3% (7/209) al cloranfenicol. Todos los 209 aislados identificados fenotípicamente como *Vibrio* amplificaron el gen *rpoA*, generando un fragmento de 242 pb. El gen *tlh* fue detectado en 40,6% (85/209) de los aislados de *Vibrio* spp., todos los que habían sido identificados fenotípicamente como *V. parahaemolyticus*. De todos los 85 aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus*, el gen *tdh* fue detectado en el 68,2% (58/85).

El gen *trh* no fue detectado en ninguno aislamiento. El gen *cth* fue detectado en 12,5% (26/209) de los aislados, los cuales habían sido identificados fenotípicamente como *V. vulnificus*. Estos aislados amplificaron un fragmento de 386 pb. La correlación entre la identificación fenotípica y genotípica de los aislados de *Vibrio* con los datos de secuenciación fue de 50% (4/8). En los aislados para los cuales no fue posible establecer esta correlación (4/8), se realizaron los ensayos bioquímicos y la identificación genotípica basada en genes específicos de especies para tratar de resolver los problemas relacionados con la identificación.

También fueron aisladas 88 cepas de Enterobacteriaceae, representadas por 29,5% (26/88) de *Escherichia coli*, 10,2% (9/88) de *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter cloacae*, 9,1% (8/88) de *Citrobacter diversus*, 7,9% (7/88) de *Enterobacter aerogenes*, 5,7% (5/88) de *Proteus vulgaris*, 4,5% (4/88) de *Serratia rubidae*, *Enterobacter sakazakii* y *Citrobacter freundii*, 3,4% (3/88) de *Hafnia alvei*, 2,3% (2/88) de *Serratia marcencens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* y *Yersinia enterocolitica* y 1,1% (1/88) de *Proteus mirabilis*.

Fue detectado 64,7% (57/88) de resistencia a la ampicilina, 39,7% (35/88) a la cefalotina, 30,7% (27/88) a la gentamicina, 26,1% (23/88) a la cefoxitina, 15,9% (14/88) a la ceftriaxona y tetraciclina, 13,6% (12/88) al cloranfenicol, 11,4% (10/88) a la ciprofloxacina, 7,9% (7/88) a la ampicilina-sulbactam y aztreonam y 1,1% (1/88) a imipenem.

El análisis microbiológico del agua de mar reveló la presencia de coliformes en el 50% (4/8) de las muestras recogidas en Arraial del Cabo.

Además, se detectó un total de 12 cepas de *Aeromonas* spp. Existe una necesidad de conocer mejor acerca de este organismo con el fin de elucidar su importancia real para los campos de la microbiología y de vigilancia de la salud.

La patogenicidad intrínseca de algunas especies bacterianas, junto con la resistencia a algunos antibióticos, es importante para evaluar la calidad microbiológica de los mejillones, garantizando una mayor seguridad a los manipuladores y consumidores.

4 Conclusión

La asociación entre los seres humanos, los organismos acuáticos y microorganismos señala la importancia de la vigilancia ambiental responsable a través de un control sistemático de las cepas circulantes y su posible importancia clínica y potencial patogénico. Los resultados obtenidos en este estudio indican que el consumo de mejillones sin cocción previa puede resultar en enfermedades en los seres humanos caracterizadas por síntomas gastrointestinales.

Palabras-clave: *Aeromonas*. Coliformes. Mejillones. Mitilicultura. Salud pública. *Vibrio*

LISTA DE ABREVIACÕES

APA: Água Peptonada Alcalina
CTH: Hemolisina Citolisina Termoestável
°C : Graus Centígrados
GSP: Pseudomonas-Aeromonas Seletivo
Km: quilômetro
L: Litro
LIA: Lysine Iron Agar
LST: Lauryl Sulfato Triptose
m: metro
MH: Müeller Hinton
mL: mililitro
NMP: Número Mais Provável
S: Sul
UFC: Unidade Formadora de Colônia
RPOA: Subunidade Alfa da RNA Polimerase
TCBS: Ágar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose
TDH: Hemolisina Termoestável Direta
TLH: Hemolisina Termolável
TRH: Hemolisina Termoestável Relacionada
VNC: Viável Mas Não Cultivável
VM : Vermelho de Metila
VP : Voges-Proskauer
VVH: *Vibrio vulnificus* Hemolisina
W: Oeste

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Costão rochoso localizado no Arquipélago de Santana, Bacia de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 23
- Figura 2** Sistema de cultivo de mexilhões em *longline*, localizado na Praia do Leste em Angra dos Reis, Baía da Ilha Grande, Brasil. 24
- Figura 3** Sistema de cultivo de mexilhões em *longline*, localizado na Praia do Forno em Arraial do Cabo, Brasil. 24
- Figura 4** Mexilhão *Perna perna* com valvas abertas para processamento da massa corpórea e líquido intravalvar. 26
- Figura 5** Crescimento de *Vibrio* spp. em ágar TCBS. Colônias amarelas: Sacarose positiva; colônias verdes: sacarose negativa. 27
- Figura 6** Crescimento de *Vibrio* spp. em ágar GSP. Colônias rosas: Amido negativo. 28
- Figura 7** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *rpoA* (242 pb) de bactérias isoladas de mexilhões. **M**: Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). **1-5**: Isolados fenotipicamente caracterizados como *Vibrio* sp. **6**: Branco. 48
- Figura 8** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do *rpoA* (242 pb) e do gene espécie específico de *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*-450 pb) isolados de mexilhão. **M**: marcador de peso molecular (100 pb) Fermentas; **1,2,3**: Isolados de *V. parahaemolyticus*; **4**: Controle negativo: Isolado de *V. vulnificus*; **5**: Branco. 49
- Figura 9** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene espécie específico (*tlh*-450 pb) e do gene de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*-269 pb) isolados de mexilhão. 50
- Figura 10** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *rpoA* (242 pb) e do gene de espécie específico *cth* (386-pb) de *Vibrio vulnificus* isolados de mexilhão. **M**: marcador de peso molecular (100 pb) Fermentas; **1-2**: Isolados de *V. vulnificus*; **3, 4, 5, 6**: Isolados de *Vibrio parahaemolyticus*; **7**: Branco. 51
- Figura 11** Cladograma obtido pela relação filogenética de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* baseado no gene *rpoA* utilizando o método Neighbor-Joining. Números nos ramos indicam o valor de bootstrap baseado em 1000 replicatas. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados para <i>Vibrio</i> spp. segundo o CLSI (2007; 2011).	31
Tabela 2	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados para enterobactérias segundo o CLSI (2007; 2011).	32
Tabela 3	Primers e ciclos empregados nos ensaios de amplificação do gene de identificação do gênero <i>Vibrio</i> e dos genes de identificação e virulência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> .	33
Tabela 4	Médias colimétricas expressas em NMP/100mL, das amostras da água do mar em Arraial do Cabo.	35
Tabela 5	Número de espécies de enterobactérias isoladas nos três pontos de coleta.	37
Tabela 6	Percentual de Resistência Antimicrobiana de Enterobactérias nos Diferentes Pontos de Coleta.	38
Tabela 7	Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de Enterobactérias Isoladas de Mexilhões coletados em Angra dos Reis.	39
Tabela 8	Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de Enterobactérias Isoladas de Mexilhões coletados em Arraial do Cabo.	39
Tabela 9	Perfil de distribuição das espécies de <i>Vibrio</i> isoladas nos diferentes pontos de coleta.	42
Tabela 10	Percentual de resistência antimicrobiana de <i>Vibrio</i> spp. nos diferentes pontos de coleta.	44
Tabela 11	Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de <i>Vibrio</i> Isoladas de Mexilhões coletados em Angra dos Reis.	44
Tabela 12	Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de <i>Vibrio</i> Isoladas de Mexilhões coletados em Arraial do Cabo.	45
Tabela 13	Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Vibrio</i> spp. provenientes de mexilhões coletados em Angra dos Reis.	46
Tabela 14	Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Vibrio</i> spp. provenientes de mexilhões coletados em Arraial do Cabo.	46
Tabela 15	Identificação dos isolados de <i>Vibrio</i> spp. segundo análise fenotípica, genotípica e o resultado da busca por similaridade no NCBI com o programa Blastn	52
Tabela 16	Provas fenotípicas e genotípicas de identificação de espécies do gênero <i>Vibrio</i> .	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância Sócio-Econômica da Maricultura	3
2.2 Biologia dos Mexilhões	7
2.3. Ambiente Aquático	8
2.4. Qualidade Microbiológica dos Mexilhões	9
2.5 Gênero <i>Vibrio</i>	9
2.5.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
2.5.2 <i>Vibrio vulnificus</i>	13
2.5.3 <i>Vibrio alginolyticus</i>	15
2.5.4 <i>Vibrio cholerae</i>	15
2.5.5 Outras espécies de <i>Vibrio</i>	16
2.6 Características Genotípicas e sua Utilização na Identificação de <i>Vibrio</i> spp.	17
2.7 Gênero <i>Aeromonas</i>	18
2.8 Enterobactérias	19
2.9 Resistência Antimicrobiana	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Pontos de Coleta	23
3.2 Análise Microbiológica da Água do Mar	25
3.2.1 Amostragem	25
3.2.2 Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	25
3.3 Análise Microbiológica dos Mexilhões	25
3.3.1 Amostragem	25
3.3.2 Processamento das amostras	26
3.4 Pesquisa de Micro-organismos com Potencial Patogênico	27
3.4.1 Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp. e <i>Aeromonas</i> spp.	27
3.4.2 Pesquisa de enterobactérias	30
3.5 Controle	31
3.6 Perfil de Suscetibilidade dos Micro-organismos Isolados aos Fármacos de Eleição	31
3.6.1 Inóculo	32
3.6.2 Difusão em disco	32
3.7 Ensaio de Detecção Gênica e Extração de DNA Bacteriano	32
3.8. Caracterização Genotípica do Gênero <i>Vibrio</i> e Identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> .	33
3.9 Sequenciamento do Gene <i>rpoA</i> (subunidade alfa da RNA polimerase) e Análise das Sequências de DNA	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes na Água do Mar	35
4.2 Pesquisa de Enterobactérias e Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana	36
4.3 Pesquisa de <i>Aeromonas</i>	41
4.4 Identificação de <i>Vibrio</i> spp.	41
4.4.1 Identificação fenotípica das espécies de <i>Vibrio</i> .	41

4.4.2 Perfil de suscetibilidade de <i>Vibrio</i> spp. isolados de mexilhões <i>Perna perna</i>	43
4.5 Identificação Genotípica do Gênero <i>Vibrio</i> .	48
4.5.1 Identificação genotípica de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	48
4.5.2 Identificação genotípica de <i>Vibrio vulnificus</i>	51
4.6 Sequenciamento de <i>Vibrio</i> spp.	52
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que se alimentam de micro-organismos suspensos na água e não apresentam capacidade seletiva de filtração do seu alimento. Por se alimentarem destas partículas em suspensão na água podem representar importante veículo de transmissão de bactérias e vírus patogênicos, além de metais pesados e outras substâncias tóxicas, que por ventura estejam nestas águas, sendo por isso conhecido como bioindicadores de contaminação ambiental. Seu cultivo comercial é uma prática que tem crescido em todas as regiões litorâneas do Brasil devido ao seu valor comercial e valor nutritivo e devido às riquezas dos recursos naturais do ecossistema aquático.

A diversidade do ambiente marinho encontra-se ameaçada em algumas áreas por conta da poluição decorrente de áreas densamente povoadas, lançamento de poluentes em rios, descarga de efluentes industriais, derramamento de óleo, descarga de água de lastro de embarcações e desmatamento. Este fato se torna um problema à saúde pública quando compromete áreas de cultivo ou extração de moluscos, os quais são utilizados na alimentação humana. Os micro-organismos e metais pesados são os contaminantes mais perigosos porque nem sempre causam alterações aparentes ou imediatas e o molusco, embora contaminado, pode ser considerado apto para consumo.

A análise microbiológica dos mexilhões reflete a qualidade do seu habitat aquático e estes organismos devem ser constantemente monitorados a fim de garantir a produção de um alimento inócuo para a saúde humana.

Os membros da família Vibrionaceae são habitantes naturais de ambientes marinhos e estuários e muitos podem causar infecções em humanos, podendo estar associados a manifestações gastrointestinais sob a forma de surtos ou casos esporádicos após a ingestão de pescado e moluscos bivalves sem cocção ou insuficientemente cozidos. A infecção por *Vibrio* spp. também pode, em alguns casos, apresentar quadros clínicos de septicemia, otites, infecções de pele e tecidos moles. As infecções são, geralmente, adquiridas por consumo de alimento e água contaminada ou mais raramente, por contaminação direta de feridas cutâneas ocorrida durante o contato com a água do mar ou estuarinas.

A expressão de fatores de resistência e virulência em micro-organismos patogênicos permite sua sobrevivência no organismo hospedeiro e confere capacidade de provocar infecção. O gênero *Vibrio* apresenta versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. O repertório genético desta bactéria para adaptação a mudanças e ambientes hostis, foi demonstrado pelo surgimento de cepas que manifestaram mecanismos de resistência aos antimicrobianos logo após a introdução destes fármacos na prática clínica.

O gênero *Vibrio* apresenta uma variedade de espécies que possuem características bioquímicas em comum, o que por vezes, dificulta a identificação fenotípica de espécies. Desse modo, métodos moleculares podem complementar a identificação do gênero *Vibrio* e suas espécies. A detecção de genes alvos como o gene da subunidade RNA polimerase (*rpoA*), encontrado em todas as cepas de *Vibrio*, tem sido utilizada para a caracterização genotípica deste gênero.

Para a identificação genotípica de *Vibrio parahaemolyticus* pode-se detectar a hemolisina termolábil através da presença do gene *tlh*, espécie-específico, encontrado em todos os isolados clínicos e ambientais de *V. parahaemolyticus*. Além disso, genes de virulência como *tdh* (hemolisina termoestável direta) e *trh* (hemolisina termoestável relacionada) podem ser detectados em cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus*.

A presença de uma exotoxina termolábil, com ação de hemolisina-citolisina e codificada pelo gene *cth*, tem sido relatada como um marcador específico e de virulência de *Vibrio vulnificus*.

Além do gênero *Vibrio*, a detecção de enterobactérias nos mexilhões e na água do mar utilizada para o cultivo destes organismos apresenta importância em saúde pública, visto sua capacidade de filtração. A transmissão das enterobactérias no geral se dá por via fecal-oral e ocorre através da ingestão de alimentos contaminados. Tradicionalmente, estas bactérias têm sido consideradas como indicadores de poluição fecal em águas e sua detecção reflete a condição geral do ambiente marinho.

O gênero *Aeromonas* não está relacionado a condições sanitárias inadequadas por não terem correlação com micro-organismos indicadores de contaminação fecal. No entanto este micro-organismo está amplamente distribuído pelo ambiente aquático, sendo isolados de peixes, ostras, camarões e mexilhões, sendo responsáveis por gastroenterites, caracterizando-se por diarreia aguda, aquosa autolimitada e de curta duração.

O presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar as espécies bacterianas de importância em Saúde Pública associadas aos bivalves, bem como avaliar a qualidade microbiológica de mexilhões provenientes de fazendas de mariculturas, situadas no Estado do Rio de Janeiro, a fim de se obter informações sobre o risco potencial à saúde dos maricultores, pescadores e da população consumidora. Associado a isso, o presente trabalho visou detectar o perfil de resistência antimicrobiana dos isolados bacterianos e os genes marcadores e de virulência a partir de *Vibrio* spp.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Executar o levantamento e a identificação de bactérias presentes na microbiota de moluscos bivalves incrustados em costões rochosos no Arquipélago de Santana em Macaé, próximo a cabos subaquáticos e em fazendas de maricultura em Angra dos Reis, na Baía de Ilha Grande, e em Arraial do Cabo, todos localizados no estado do Rio de Janeiro.
- Avaliar por meio de métodos fenotípicos a resistência aos agentes antimicrobianos dos isolados bacterianos provenientes dos mexilhões;
- Avaliar a qualidade microbiológica da água destinada ao cultivo de mexilhões.
- Confirmação do gênero *Vibrio* através da detecção do gene *rpoA*; e
- Detecção dos genes espécie-específicos e de virulência em isolados de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

Os mexilhões avaliados foram coletados através de mergulho autônomo próximos a cabos subaquáticos e costões rochosos, no Arquipélago de Santana em Macaé, e em fazendas de maricultura na Baía de Ilha Grande e em Arraial do Cabo, todos localizados no Estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Sócio-Econômica da Maricultura

No cenário nacional, a pesca está incluída entre as quatro maiores fontes de fornecimento de proteína animal para o consumo humano. Além de sua importância para a nutrição, os recursos pesqueiros requerem uso e manejo sustentável por sua importância sócio-econômica, ambiental e cultural. A sustentabilidade dos recursos pesqueiros depende de vários fatores, entre esses, da pesca, do tamanho da frota, retorno econômico, a existência de políticas de subsídios e incentivos, o emprego de métodos predatórios de pesca, degradação dos habitats, as várias formas de poluição marinha, doméstica, industrial e decorrente do uso de insumos agrícolas; o desmatamento e a degradação dos recursos hídricos; oscilações climáticas e oceânicas (FIPERJ, 2008).

A produção pesqueira mundial encontra-se estabilizada em torno de 100 milhões de toneladas. A maior parte dos estoques pesqueiros tradicionais encontra-se em declínio, principalmente devido à sobrepesca e a outros fatores antrópicos tais como a poluição (DULVY et al., 2003; PAULY; WATSON, 2004; FAO 2009; NETO et al., 2010). No Brasil, a extração de recursos marinhos tem sido uma atividade rotineira das comunidades costeiras, tendo passado de uma atividade equilibrada e aceitável como subsistência e para a complementação de renda familiar para outra de dimensões drásticas de sobreexploração predatória (FAGUNDES et al., 2004). O declínio da pesca no litoral brasileiro decorrente dessa sobrepesca predatória e da poluição vem impondo as comunidades uma nova realidade, onde a economia não suplanta mais a condição de sobrevivência da atividade, provocando êxodo das famílias para outras regiões, o abandono em massa da atividade pesqueira ou a transferência para atividades mais promissoras, como o caso da mitilicultura.

A mitilicultura pode então constituir uma alternativa para o sustento de comunidades pesqueiras defrontadas com a crise na pesca (BERRE, 1995; HENRIQUES, et al., 2000). Ramo da aquicultura responsável pelo cultivo de ostras e mexilhões que apresentam grande valor comercial, a mitilicultura surgiu na Europa há cerca de 750 anos, tornando-se considerável fonte alimentícia e de renda para diversas populações litorâneas em vários países. Pelo fato do cultivo ser realizado com relativa facilidade, requerendo pequeno investimento para a implantação e simplicidade de manutenção, a atividade vem crescendo em todo o mundo e tem sido reportada por diversos autores como excepcional alternativa de produção e renda, principalmente para pescadores artesanais (ARANA, 1999; VINATEA, 2000).

A mitilicultura apresenta grande relevância na alimentação mundial, justamente em um período onde as fronteiras agrícolas praticamente não apresentam capacidade de expansão e as fronteiras marinhas ainda apresentam enorme possibilidade de ampliação. Estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU) apontam que a pesca e aqüicultura são atividades consideradas estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta no futuro, pois estas são capazes de fornecer proteínas, além de gerar significativo número de empregos (SIMON; SILVA, 2006).

No Brasil são cultivadas quatro espécies de moluscos (malacocultura): o mexilhão (*Perna perna*), a ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), a ostra nativa (*Crassostrea rhizophorae*) e a vieira (*Nodipecten nodosus*), sendo o mexilhão *Perna perna* o de maior interesse econômico cultivado no país (FAMASC, 2002). Os mexilhões são moluscos marinhos pertencentes à família dos Mitilídeos, advindo daí o nome "mitilicultura" (MORAES, 2005).

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) vive na costa oeste do Atlântico, desde a Ilha Margarita e Cumaná (Venezuela) até a Ilha de Lobos e Punta del Este (Uruguai), sendo abundante entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina (KLAPPENBACH, 1964). Essa espécie é o Mytilidae de maior tamanho e o mais abundante na costa brasileira. Apresenta uma grande importância sócio-econômica devido ao seu uso na mitilicultura, disponibilizando para o consumo humano uma fonte protéica barata proporcionado pelos sistemas de cultivos costeiros (RESGALLA JR., et al., 2008). Por ser um molusco bivalve, alimenta-se por filtração de fitoplâncton e partículas de matéria orgânica em suspensão na água do mar (MORAES, 2005), sendo a pureza da água e ausência de poluição essencial para a qualidade da produção.

O cultivo experimental de bivalves, no Brasil, foi iniciado na década de 70 por institutos de pesquisas, universidades e secretarias de agricultura, principalmente nos estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. As primeiras tentativas de implantação dos primeiros cultivos em Santa Catarina ocorreram no final dos anos 80, quando técnicos da Universidade Federal de Santa Catarina e da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina iniciaram, juntos com os pescadores da região, pequenas unidades de produção (ANDREATTA, 2000). No entanto, foi somente a partir de 2000 que a atividade despontou como agronegócio (FAGUNDES et al., 2004).

Existem três formas de obtenção das sementes: raspagem nos costões, o uso de coletores artificiais (estruturas próximas ao cultivo para a fixação natural das larvas) e a reprodução em laboratório, que implica manejo de reprodutores, alimentação artificial e criação de larvas. Por razões econômicas e de preservação ambiental, o sistema de fixação artificial é o mais recomendável. Isto é possível em virtude do mexilhão ser uma espécie nativa, que ocorre naturalmente nas regiões costeiras.

No Brasil, as sementes de mexilhão são obtidas no meio ambiente natural. Até agora não foi necessária a realização de produção de sementes em laboratório. As sementes são colocadas em coletores de PVC de 1,5m, onde é possível recolher até 30 quilos de sementes de 2 a 3 cm, suficientes para povoar 10 cordas de 1,2 metros. Por outro lado, existe a preocupação de otimizar sua captura no meio ambiente com a demarcação de áreas de captura exclusiva e também o aproveitamento daquelas que naturalmente se fixam nos cabos de cultivo (POLI; LITTLEPAGE, 1998). Dessa forma, o ideal é a obtenção de sementes através da utilização de coletores artificiais de PVC que são estruturas manufaturadas e introduzidas na água, com a função de captar as sementes de mexilhão.

As sementes, depois de coletadas, são lavadas em água do mar para remoção de lama e de outros organismos aderidos. No entanto, as cordas onde ocorre a fixação das sementes com a secreção de um novo bisso são cercadas por uma malha fina tipo meia. Assim, as cordas já com as sementes fixadas são levadas ao mar para o cultivo. A malha que a envolve se decompõe com o tempo. O único material adquirido para a confecção das cordas é a rede de algodão ensacadora, pois esta serve de apoio às sementes de mexilhão e é confeccionado com material de pouca durabilidade, o suficiente para permitir que as sementes se fixem no cabo central (POLI; LITTLEPAGE, 1998). O ensacamento de sementes pode ser grosseiramente comparado ao enchimento de uma meia de algodão com 1,2m de comprimento. Nessas cordas são colocadas as sementes, cerca de 1,5kg/m de corda. Depois de prontas, são postas nas estruturas com distanciamento mínimo de 0,5 m entre si (FRANCO, 1993).

Os mexilhões também podem ser cultivados em balsas, construídas de bombonas e bambus, que são amarradas às cordas com os mexilhões. As balsas podem ser montadas com cinco bombonas de 200 litros de capacidade, quatro nos cantos e uma no centro. Essas balsas podem ser colocadas em locais com uma profundidade de aproximadamente oito metros em mar aberto presas a âncoras. As cordas com as sementes ficam então estendidas e suspensas nas balsas. Em Santa Catarina, os pescadores constroem, por conta própria, pequenas balsas

de bambu nas quais colocam as sementes de mexilhões, coletadas nos costões das praias rochosas da ilha (POLI; LITTLEPAGE, 1998). Assim sendo, a abundância de sementes no meio natural e a sua desnecessária produção em laboratório permitiram que os pescadores criassem estruturas permanentes para cultivo e usassem um sistema até hoje empregado, denominado de suspenso-fixo.

Outra alternativa para o cultivo de mexilhões é o sistema de cultivo em espindel, o qual pode ser utilizado em profundidades superiores a três metros e é constituído de cabos dispostos horizontalmente com flutuadores onde são amarradas e penduradas as cordas de produção.

A mitilicultura desenvolvida de maneira artesanal beneficia economicamente, em sua grande maioria, famílias de pescadores artesanais e pequenas empresas de produtores. Os produtos são vendidos na sua maioria *in natura*, e quando muito, beneficiados de maneira precária pelos próprios produtores. O cultivo de mexilhões e ostras vem dinamizar a economia do Estado, beneficiando mais particularmente o pequeno produtor, que tem na atividade um meio de subsistência para sua família, uma vez que somente a pesca, por sua sazonalidade, não lhe permite uma situação financeira estável (ARANA, 1999).

Segundo Brandini et al. (2000) o Brasil possui grandes vantagens competitivas em relação aos demais países que cultivam moluscos filtradores devido a grande quantidade de baías, enseadas e regiões estuarinas e lagunares. Aliada ao fator geográfico existe ainda uma excelente produtividade natural, com aspectos biológicos da espécie *Perna perna* que atinge seu tamanho comercial em um tempo relativamente baixo. A abundante disponibilidade de sementes que podem ser captadas no próprio ambiente, através da utilização de coletores manufaturados, para produção de sementes, também deve ser destacada.

Embora a indústria da aquíicultura no Brasil venha crescendo a uma taxa superior a 15% ao ano, o potencial para a expansão dessa atividade ainda é pouco aproveitado. Isso se deve, entre outras questões, à falta de uma política efetiva para organizar e promover o desenvolvimento da aquíicultura como produtora de alimentos. Muito embora não se tenha um diagnóstico de ciência e tecnologia para a atividade, é possível inferir que as pesquisas no tema, além de dispersas territorialmente, se caracterizam pela falta de uma integração entre os setores que compõem os diversos elos de sua cadeia produtiva (EMBRAPA, 2002).

No entanto, é necessária a condução de ações que orientem os produtores na gestão da produção e das demandas surgidas pelos beneficiários tais como cursos, apoio a comercialização e obtenção de crédito. A produção, na sua grande maioria, é comercializada *in natura* no mercado local, regional e somente uma pequena parte é comercializada no mercado nacional devido às limitações impostas pela distância (conservação) e pela necessidade de Sistema de Inspeção Federal (HENRIQUES, 2001). Para a melhoria da atividade, algumas medidas poderiam ser adotadas como a facilitação de crédito para os pequenos produtores e a coparticipação do setor na política ambiental, promovendo o incentivo do mercado aquícola, com a preocupação na preservação de áreas ambientais associadas à exploração sustentável dos recursos naturais.

A maricultura implantada no Estado do Rio de Janeiro vem permitindo às comunidades locais se beneficiarem desta atividade zootécnica de forma auto-sustentada em sintonia com o ecossistema costeiro. A viabilidade econômica da atividade vem proporcionando o ingresso de novos maricultores, beneficiando as gerações presentes e criando perspectivas para as gerações futuras. Estas sociedades passaram a ter um papel definitivo na determinação, planificação e execução de suas prioridades diminuindo, assim, os conflitos e compatibilizando as alternativas econômicas (FIPERJ, 2008).

Os cultivos também vêm contribuindo para a fixação das populações tradicionais em seus locais de origem, além de terem modificado substancialmente a maneira como essas populações encaram a necessidade da preservação do meio ambiente, pois a idéia de cultivar o

mar impõe a necessidade de manutenção deste. Uma vez que os impactos são gerados pelo cultivo, este serão absorvidos pelo ambiente, e a não observação da capacidade de suporte poderá levar ao declínio da produção e até mesmo a extinção da atividade (SODRÉ, 2001).

Dentro do contexto social, a participação familiar na complementação de renda se dá pelo extrativismo, com a raspagem dos mexilhões no costão rochoso realizada por mulheres e crianças, ficando o homem encarregado da pesca e da manutenção e manejo do cultivo. O beneficiamento também é realizado por mulheres e crianças, onde basicamente é retirada a concha e a carne é aquecida apenas para a abertura das valvas e embalada para a comercialização.

Um dos principais problemas ambientais relacionados ao cultivo de mexilhões está na preservação dos bancos naturais destes organismos nos costões rochosos, uma vez que as sementes retiradas dos costões rochosos não são suficientes para suprir criações comerciais e possibilitar a expansão da atividade de cultivo de mexilhões (*Perna perna*), gerando, assim, uma pressão antrópica negativa sobre os ecossistemas naturais, tornando-se necessária à instalação de coletores artificiais de sementes (MARQUES et al., 1998; DALBOSCO et al., 2008). A retirada das sementes do costão torna-se um problema devido o uso de pás para raspar a rocha retirando junto com os moluscos os substratos aonde novas larvas iriam se fixar. O desaparecimento dos mariscos reflete-se na fauna que se alimenta destes animais, como os poliquetas. Além disso, a intensa atividade de raspagem nas rochas prejudica o turismo por causa da poluição visual. Os marisqueiros que dependem da extração de mexilhões do costão para sobreviverem, que vêm ameaçada sua fonte de renda, também acabam se tornando um entrave na expansão da maricultura, pois eventualmente não avaliam esta atividade pela ótica do desenvolvimento sustentável e do desenvolvimento da comunidade em parceria da conservação do habitat natural (SODRÉ et al., 2001).

A coleta dos mexilhões se torna um problema ainda maior quando se observa despejos de esgoto na praia, formando as conhecidas “línguas-negras” e, bem próximo a elas, a presença de catadores de mexilhões fazendo a extração dos animais nos costões e nas pedras submersas. Nesses mesmos locais, retiram as conchas e realizam o pré-cozimento da carne do molusco, em fogareiros improvisados dentro de latas de 20 litros sem a menor condição de higiene e o comercializam (JORGE et al., 2002).

A exploração dos recursos vivos que ocorrem nos costões rochosos vem sendo constantemente afetado também por efluentes e resíduos antrópicos, tendo como resultado, a perda da biodiversidade e de áreas biologicamente produtivas (DALBOSCO et al., 2008).

Para se contornar tal desafio, seriam necessárias ações de educação ambiental voltadas para as comunidades envolvidas com a cata e também com o cultivo do mexilhão e maior atuação do poder público no tocante a fiscalização mais efetiva, visando o combate à má exploração das sementes de mexilhão nos costões (SODRÉ, 2001).

Por outro lado, a expansão da extração de mexilhões tem representado novas oportunidades de trabalho, pois, embora prevaleça o envolvimento da mão-de-obra familiar, ocorre também a utilização de pessoas contratadas. Segundo a FAMASC (2002) em 1990 foram produzidas 19 toneladas de mexilhões sendo que em 2001 a produção alcançou 10.667 toneladas.

Segundo a FAO, a produção mundial de mexilhões, em 2006, alcançou 1.890.131 ton, o que significou um valor de 1,2 milhões de dólares. A China é o principal produtor concentrando 37% do mercado mundial, seguido da Tailândia (14%), Espanha (12%) e Chile (6%). O aumento da produção tem sido acompanhado pela crescente inserção do produto no mercado internacional. Os principais exportadores são Países Baixos (22%), seguido da Nova Zelândia (13%), Espanha (11%) e Dinamarca (9%). Em 2007, as importações mundiais somaram 550 milhões de dólares. Cabe destacar que o comércio internacional está altamente concentrado em economias desenvolvidas, em especial na União Européia (FAO, 2008).

Destaque para Nova Zelândia Pode-se se dizer que os neozelandeses adaptaram a mecanização espanhola para o cultivo em espinhéis. Com a vantagem de começar depois dos principais produtores mundiais (China, Espanha e Holanda), eles perceberam logo que não havia sentido em repetir os mesmos erros pelos quais seus precedentes haviam passado e por isto tiveram uma vantagem em termos de investimentos e tempo porque procuraram aprender com os erros dos que já passaram pela fase inicial de desenvolvimento. Enquanto a produção de mexilhões dos três maiores produtores manteve-se relativamente estável ou até mesmo decaiu em decorrência de problemas causados pela superação da capacidade de suporte, na última década a indústria neozelandesa teve um crescimento constante, atingindo 90 mil toneladas, e o mexilhão tornou-se o terceiro produto marinho mais exportado por este país. Em 1988, as exportações de mexilhão que já geravam US\$ 24 milhões, atingiram em 2000 um volume de 30 mil toneladas no valor de US\$ 170 milhões. Isto representa um aumento de 708% para o período de 12 anos. As cifras vêm de 605 fazendas com uma área marinha totalizando mais de 2.850 hectares, com um valor médio de exportação de aproximadamente US\$ 60.000 por hectare utilizado na produção de mexilhões (EPAGRI, 2000).

Para alcançar estes resultados, os neozelandeses planejaram e estruturaram cuidadosamente sua cadeia produtiva. Em 1972, o “New Zealand Fishing Industry Board” iniciou um programa de pesquisa e desenvolvimento que duraram nove anos. Este programa resultou numa tecnologia de cultivo mecanizado. A indústria começou a florescer quando todos os produtores optaram por abandonar os velhos métodos de plantio e colheita manual e adotaram o novo método que reduziu o trabalho e aumentou a produtividade. Este país é tido como uma referência mundial por apresentar os maiores índices de produtividade praticados no cultivo de mexilhões. Uma vez que a indústria neozelandesa passou a fixar os padrões pelos quais eficiências e produtividades são medidas, é importante lembrar que não se chegou ao nível atual de mecanização da noite pro dia, mas este foi o resultado de um trabalho de diversas indústrias, instituições e indivíduos atuando em conjunto (ALFARO, 2005).

O contexto da mitilicultura na Argentina é bastante semelhante ao do Brasil. Os primeiros ensaios de cultivo de mexilhões no país foram realizados de modo experimental no fim da década de 70 na província do Chubut, e posteriormente em Santa Cruz. Em 1979, foram iniciados os ensaios no Golfo San Matías (Río Negro), que culminaram em uma produção inicial (1987-1988) de 2,5 ton. até chegar ao patamar de 15 ton. entre 2000-2002. A produção argentina se concentra em Las Grutas, Rio Negro e no Canal de Beagle, na Terra do Fogo. O Canal de Beagle é relatado como um local que apresenta boas condições para o cultivo de mexilhões onde as águas são ricas em plâncton, dando condições de engorda para estes animais (FAGUNDES, 2001).

2.2 Biologia dos Mexilhões

Os mexilhões são moluscos bivalves filtradores que possuem a capacidade de reter micro-organismos captados pela corrente de água através do batimento dos cílios e das brânquias. Não apresentam capacidade seletiva de filtração do seu alimento, sendo a ingestão de partículas selecionada apenas pelo tamanho. O fitoplâncton e os detritos são a principal fonte de alimento para o seu crescimento. Por serem filtradores, estes moluscos se revelam adequados à utilização como bioindicadores devido à natureza sésil e sua ampla distribuição. Durante o processo fisiológico da alimentação, a água entra na cavidade palial através do sifão aspirante, passando pela brânquia da óstia e é expelida pelo sifão expirante. Ambos os sifões possuem um véu que pode regular o fluxo da corrente de água. As partículas de alimentos são presas pelo muco espalhado sobre as lamelas branquiais concentrando-se assim, nos tecidos dos moluscos (BEIRÃO et al., 2000; LIRA et al., 2001).

São invertebrados, de simetria bilateral e que essencialmente estão compostos por quatro regiões: cabeça, pé, saco visceral e manto. Os moluscos da classe Bivalvia vivem exclusivamente na água, possuem concha formada por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento. Seu habitat natural é a região do mesolitoral de costões rochosos, podendo estender-se até o infralitoral. Vivem presos pelo bisso a substratos consolidados, tanto em locais com forte arrebentação como em pontos mais abrigados, sendo, porém mais abundantes em costões rochosos expostos à ação das ondas. Como vivem principalmente na região de entre marés, estão adaptados a permanecer por longos períodos expostos ao ar e ao sol (LIRA et al., 2001).

Quando fixos aos costões rochosos são chamados “bancos naturais” constituindo um rico ecossistema que abrange não só os mexilhões, mas também um grande número de organismos vegetais e animais que vivem a eles associados, principalmente cracas, poliquetas, anfípodes, pequenos caranguejos e gastrópodes, bem como algas verdes, pardas e vermelhas (MARQUES, 1988; FREITAS, 1997). De fato, qualquer substrato consolidado pode servir como ponto de fixação, o que permite a ocorrência de incrustações em dutos, e em cabos subaquáticos utilizados para transmissão de dados para plataformas petrolíferas.

Possuem uma taxa elevada de bombeamento de água, estimada entre 0,5 a 4 litros por hora dependendo do seu tamanho e das condições ambientais. Em todo o mundo existem classificadas mais de 20.000 espécies de moluscos bivalves, dentre estes, destaca-se o *Perna perna* (GOTTING, 1974; LINDNER, 1989) que atualmente apresentam a seguinte classificação taxonômica: Filo Mollusca; Classe Bivalvia; Ordem Mytiloida; Família Mytilidae; Gênero *Perna* e espécie *Perna perna* (MARQUES et al., 1998).

O gênero tropical *Perna* encontra-se distribuído pelos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África) e Índico (África, Ásia e Oceania) e no mar Mediterrâneo, na Costa Africana. Esta espécie foi, provavelmente, introduzida no Brasil nos séculos XVI e XIX com as águas de lastro e/ou incrustações dos navios negreiros vindos da África. Hoje é abundante entre o litoral do Espírito Santo e Rio Grande do Sul (SOUZA, 2003).

A espécie *Perna perna*, anteriormente denominada *Mytilus perna*, é estritamente dióica, tendo a reprodução sexuada como padrão reprodutivo. O dimorfismo sexual em bivalves é muito raro, normalmente reconhecido pelo exame microscópico das gônadas. No caso do *P. perna*, machos e fêmeas podem ser diferenciados, internamente, em algumas fases do ciclo reprodutivo, quando a coloração das gônadas nos machos apresentam-se branco-leitosa e nas fêmeas vermelho-alaranjado (LUNETTA, 1969).

Os bivalves marinhos constituem estoques naturais de recursos renováveis que dependem de todo um ecossistema em equilíbrio para sua reprodução e desenvolvimento.

2.3. Ambiente Aquático

A água é um elemento de importância fundamental para a sobrevivência do homem. Seu desempenho no setor industrial e agropecuário, no abastecimento público e na preservação da vida aquática confirma esta importância. É no ambiente marinho, por exemplo, que mariscos são retirados para a alimentação humana. Apesar disso, a diversidade do ambiente marinho encontra-se ameaçada em algumas áreas, por conta da poluição decorrente de áreas densamente povoadas, o lançamento de poluentes em rios, a descarga de efluentes industriais, o derramamento de óleo, a descarga de água de lastro de embarcações e o desmatamento. Este fato se torna um problema à saúde pública quando compromete áreas de cultivo ou extração de moluscos, os quais são utilizados na alimentação humana. Associado a isto, os banhistas podem ingerir micro-organismos acidentalmente.

Devido os moluscos bivalves ser conhecidos como bioindicadores de contaminação ambiental, autores como Martinez et al. (2010) e Falconer (1993) sugerem a utilização destes

organismos a fim de monitorar a presença de todos os agentes biológicos e abióticos que se encontram na água onde vivem. Segundo Moreira et al. (2011) e Beirão et al. (2000) os moluscos bivalves, quando em processo de alimentação, podem filtrar entre 19-50 Litros/hora da água onde habitam e podem portanto, durante este processo, concentrar em seu interior micro-organismos.

A avaliação da qualidade microbiológica de mexilhões provenientes de costões rochosos ou de fazendas de maricultura fornece informações sobre o risco potencial à saúde de pescadores, maricultores e da população consumidora. O crescente impacto sobre o ecossistema aquático costeiro aponta para a necessidade de que se reconheçam os perigos microbiológicos e as áreas de risco, a fim de que os agravos em saúde pública sejam minimizados.

2.4. Qualidade Microbiológica dos Mexilhões

O consumo de moluscos bivalves marinhos é uma prática em todas as regiões litorâneas do Brasil e são geralmente consumidos *in natura* sem prévio cozimento adicionado de algumas gotas de limão. Este fato torna-se um risco potencial para a saúde humana, pois os moluscos alimentam-se por processo de filtração, de partículas e micro-organismos em suspensão na água, permitindo a retenção de bactérias, protozoários e vírus patogênicos, além de metais e outros compostos químicos tóxicos e toxinas provenientes de certos micro-organismos, representando um problema de saúde pública quando oriundos de áreas poluídas ou contaminadas (BEIRÃO et al., 2000; WHO, 2005). Tais características acarretam elevada perecibilidade, exigindo cuidado no manuseio e conservação, para garantir qualidade do produto *in natura* (FERREIRA; MAGALHÃES 1992).

Além de representar risco à saúde humana pela ingestão *in natura*, os mexilhões também podem ser responsáveis por lesões teciduais decorrentes de sua manipulação por indivíduos desprovidos de equipamentos de segurança (BEIRÃO et al., 2000).

A família Enterobacteriaceae tem sido utilizada como indicadora da qualidade sanitária das águas de cultivo de moluscos bivalves. A contagem de micro-organismos viáveis em crustáceos e moluscos, animal inteiro ou a carne separada da concha, alcança populações entre 10^3 e 10^7 UFC/g. Além das enterobactérias, a literatura relata infecções por *Vibrio* spp. associados a ingestão de moluscos bivalves ou ferimentos no ambiente marinho (BRASIL, 2001).

2.5. Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae onde estão agrupadas bactérias patogênicas para o homem, causando desde gastroenterites autolimitantes até quadros graves de septicemia, podendo levar os pacientes ao óbito (GERMANO; GERMANO, 2001). São micro-organismos habitantes naturais de ambientes aquáticos, de clima tropical e temperado, presentes em águas salgada, salobra e doce, podendo estar presentes em moluscos bivalves e outros crustáceos (GIBOTTI et al., 2000; BUTT et al., 2004; WHO, 2005).

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* são bastonetes curvos ou retos Gram-negativos, medem entre 0,5 a 0,8µm de diâmetro e 1,4 a 2,4µm de comprimento, são anaeróbicas facultativas e não esporulados. A maioria das espécies patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar. Fermentam glicose sem produção de gás e são catalase positivos. Os víbrios produzem oxidase e reduzem nitrato com exceção das espécies *V. metschnikovii* e *V. gazogenes* (KONEMAN et al., 2008).

As espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, com exceção de *Vibrio cholerae*, são típicas de ambientes marinhos e estuarinos, com necessidade de NaCl para o crescimento.

Como o ambiente marinho é seu nicho natural, os vibrios são facilmente isolados de peixes e crustáceos. A maioria das espécies é mesófila com tendência a proliferação em épocas mais quentes. Fatores como temperatura e salinidade influenciam a presença de vibrios no ambiente, não havendo correlação entre patógenos entéricos humanos ou indicadores de poluição fecal (HUSS et al., 2004).

O gênero *Vibrio* possui cerca de 270 espécies, sendo 12 patogênicas ao homem como *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae* O1, O139, não O1, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, responsáveis por quadros de gastroenterite, infecções de feridas e em alguns casos, septicemia, e 14 espécies patogênicas aos animais, representadas por *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. ordalli*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. fisheri*, *V. orientalis*, *V. campbelli* e *Vibrio AK-1* (JAY, 2009).

Possuem a capacidade de se adaptar de maneira dinâmica às mudanças ambientais como temperatura, pH, salinidade e concentrações de nutrientes, utilizando uma variedade de mecanismos genéticos e fisiológicos. Um destes mecanismos é denominado de estado viável, mas não cultivável (VNC) no qual as bactérias reduzem seu volume celular e adquirem forma cocóide. Este fenômeno representa um estado de dormência, sobrevivência e persistência no meio ambiente. Nesta situação o método convencional de cultivo em placas torna-se pouco adequado, sendo necessária a utilização de técnicas de biologia molecular para sua detecção, as quais são independentes de cultivo (LLEÒ et al., 2001). Contudo, quando lhes são proporcionadas as condições ótimas para a sua proliferação, podem voltar ao estado “cultivável” normal. A ecologia dos vibrios nos sistemas aquáticos tem sido bem estudada visto que a distribuição das espécies é afetada pela salinidade, disponibilidade de nutrientes e temperatura, dentre outros parâmetros (THOMPSON et al., 2004).

Vibrio spp. geralmente se apresenta no estado VNC quando associada à superfície externa de crustáceos planctônicos, mas passa para o estado viável no intestino humano. Este fato, associado às mais altas concentrações de vibrios nos copépodes do que na coluna de água, faz com que a ingestão acidental destes microcrustáceos seja provavelmente responsável pela manifestação da cólera (COLWELL et al., 1996).

Espécies de vibrio têm sido encontradas com frequência em mexilhões coletados de fazendas de mariculturas, o que pode representar problemas à saúde do animal e do consumidor. Fatores estressantes que podem advir da própria água de cultivo, quando ocorrem alterações das propriedades físico-químicas, como a temperatura, salinidade e pH, podem desencadear o desequilíbrio do ambiente, levando o animal a uma maior vulnerabilidade a doenças. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema imune de defesa do organismo fica debilitado devido ao gasto de energia utilizado na sua adaptação às novas condições. Dessa forma, ele se torna mais vulnerável ao ataque de microorganismos presentes no meio (SMITH et al., 2008).

2.5.1. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus é uma bactéria Gram-negativa, halófila, habitante natural do ambiente marinho, especialmente em climas temperados, com distribuição mundial. Pode ser encontrado em água de estuários, sendo facilmente encontrado em águas costeiras, no sedimento, em partículas suspensas, plâncton, caranguejos, camarões, peixes, ostras, mexilhões e outros animais marinhos (BUTT et al., 2004; FARMER et al., 2005; SU & LIU, 2007). O número de *V. parahaemolyticus* na água do mar parece estar associado à concentração de zooplâncton, especialmente copépodes, e à temperatura. Desta forma, sua concentração na água do mar pode variar com fatores que produzam alterações no

zooplâncton, incluindo a temperatura, luminosidade, correntes marinhas, concentração de nutrientes e fitoplâncton (HERNÁNDEZ et al., 2005).

O isolamento de *V. parahaemolyticus* foi feito inicialmente por Fujino em 1951, a partir de um surto de gastroenterite de origem alimentar ocasionado a partir da ingestão de “shirasu” que são sardinhas novas, semidessecadas e parcialmente cozidas (SAKAZAKI et al., 1963; FUJINO et al., 1974; FARMER et al., 2005). Desde então, esta bactéria tem sido reconhecida como um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos em muitos países como Estados Unidos, França, México, Peru, Chile (GONZÁLEZ-ESCALONA et al., 2005; GIL et al., 2007; NAIR et al., 2007; SU; LIU 2007; LAM et al., 2009).

Estudos no Brasil demonstraram a presença de *V. parahaemolyticus* em amostras ambientais a partir de uma variedade de fontes, assim como em amostras clínicas (SERRA et al., 2003; MATTÉ et al., 2007; PEREIRA et al., 2007b).

As gastroenterites por *V. parahaemolyticus* estão quase sempre associadas à ingestão de água contaminada e ao consumo de frutos do mar, particularmente de pratos ao estilo da culinária japonesa, à base de frutos do mar crus ou insuficientemente cozidos, sendo os peixes e moluscos crus os principais veiculadores desta bactéria (DANIELS et al., 2000; SOUSA et al., 2004; FARMER et al., 2005).

Este micro-organismo apresenta motilidade, não são redutores de H₂S em ágar Kligler, são positivos às reações de oxidase e gelatinase, reduzem nitrato em nitrito e fermentam a galactose, glicose, manose e manitol e não fermentam a lactose, sacarose xilose, sorbitol e inositol (KONEMAN et al., 2008).

Algumas cepas de *V. parahaemolyticus* possuem a capacidade de produzir beta hemólise em Agar Wagatsuma (meio básico acrescido de eritrócitos humanos e elevada concentração de sal - 7%). O teste foi denominado Kanagawa e está estreitamente relacionado com a enteropatogenicidade, sendo adotado como parâmetro fenotípico na identificação de cepas patogênicas e não-patogênicas. Os principais fatores, incriminados como promotores da hemólise do fenômeno de Kanagawa são as hemolisinas TDH (Thermoestable Direct Hemolysin – hemolisina termoestável direta) e TRH (Thermoestable Related Hemolysin – hemolisina termoestável relacionada) consideradas importantes fatores de virulência (PEREIRA et al., 2004a; GONZALEZ et al., 2005). Estudos têm demonstrado que cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* apresentam o gene *tdh* e/ou *trh* (ROQUE et al., 2009; ROJAS et al., 2011), os quais codificam respectivamente para TDH e TRH (HONDA et al., 1991; GONZALEZ et al., 2005).

TDH é uma enterotoxina citotóxica que atua diretamente nos eritrócitos, levando a hemólise e aumento da permeabilidade vascular. Atua também na desorganização do citoesqueleto e tem a capacidade de induzir a apoptose nas células do hospedeiro (RAIMONDI et al., 2000; NAIM et al., 2001; LYNCH et al., 2005).

Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* apresentam outra hemolisina termolábil (TLH), a qual é codificada pelo gene *tlh* e é considerado marcador espécie-específico. Este gene tem sido encontrado em todos os isolados clínicos e ambientais de *V. parahaemolyticus* e não está associado com a virulência bacteriana (NORDSTROM et al., 2007; ROJAS et al., 2009; ROJAS et al., 2011).

Segundo Hoashi et al. (1990) e Yeung; Boor (2004) algumas cepas de *V. parahaemolyticus* que possuem o gene *tdh* são negativas para o fenômeno Kanagawa, sugerindo que a presença deste gene pode não refletir na capacidade da cepa em causar doença, uma vez que a expressão de *tdh* pode variar. Estas cepas podem produzir outros tipos de hemolisinas (YEUNG; BOOR, 2004).

Foi relatado recentemente que algumas cepas possuem a capacidade de hidrolisar uréia, sugerido uma forte associação com a presença de TRH. A presença desses fatores de

virulência geralmente ocorre em cepas oriundas de achados clínicos, enquanto naquelas isoladas de ambiente ou alimentos marinhos são apontados resultados negativos ou com percentuais oscilantes de até 1% no teste de hidrólise da uréia (NAKAGUCHI et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; HEITMANN et al., 2005).

Algumas evidências sugerem que cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa-positivas isoladas de ambiente aquático podem ter como reservatório os sedimentos aquáticos e a carapaça quitinosa de moluscos e copépodes. Esta característica contribui para a distribuição e ciclo anuais da bactéria no sistema estuarino (WEST, 1989).

Os sintomas causados por infecções por *V. parahaemolyticus* surgem normalmente de 4 a 96 horas após a ingestão do alimento contaminado com um elevado número de micro-organismos (100 mil a 10 milhões) e são típicos de uma gastroenterite: diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores na cabeça, calafrios e algumas vezes febre. Em raras ocasiões a infecção pode resultar em septicemia que pode se tornar fatal, porém isto ocorre sempre em pacientes que possuem uma doença pré-existente (COOK et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003). Além do seu papel na gastroenterite, *V. parahaemolyticus* é conhecido como agente causador de infecções extra-intestinais em humanos como septicemia secundária, infecções oculares, infecções do conduto auditivo e de feridas após a exposição ao ambiente marinho (JAY, 2005).

A literatura relata a presença de vários sorogrupos de *V. parahaemolyticus* responsáveis por manifestações de gastroenterite, sendo reconhecidas mais de 75 combinações de sorotipos O e K (BHUIYAN et al., 2001; PEREIRA et al., 2007). São reconhecidos 13 sorogrupos O termoestáveis e 71 sorogrupos K termo-lábeis. Cepas pertencentes ao sorovar O3:K6 ocasionaram o primeiro episódio de pandemia por *V. parahaemolyticus* ocorrido na história, surgindo abruptamente na Índia, em 1996, tendo sido disseminadas a oito países, incluindo Japão e Estados Unidos (MATSUMOTO et al., 2000). Hayat Mahumd (2006) alertam para o risco que o consumo de alimentos de origem marinha pode representar para a saúde pública, uma vez que cepas de *V. parahaemolyticus* toxigênicas (O3:K6) têm sido isoladas dessas fontes, apresentando potencial para provocar pandemias. Em 2002, segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), ocorreu um surto de gastroenterite no Ceará e cepas Kanagawa positivas O3:K6 de *V. parahaemolyticus* foram isoladas (OLIVEIRA et al., 2002).

A literatura relata a transferência horizontal genética entre cepas de *V. parahaemolyticus*, onde tem sido demonstrada a presença de variantes *tdh* no DNA plasmidial, DNA cromossomal e em outras espécies de vibrio, dando suporte a hipótese de que este gene é móvel entre as populações bacterianas (NISHIBUCHI; KAPER; 1990; CHANG et al., 1998; XIE et al., 2005).

A disseminação do gene *tdh* é suposto ser mediado por uma sequência de inserção (TERAI et al., 1991; XIE et al., 2005; NAIR et al., 2007; IZUTSU et al., 2008). Embora a maioria das espécies de vibrio não seja patogênica, elas são consideradas um grande reservatório de genes de virulência. A mobilidade dos genes de virulência e uma transferência bem sucedida podem causar a transformação de uma cepa não patogênica em patogênica (BOYD et al., 2000; HENTSCHEL et al., 2000; FARUQUE & NAIR, 2002).

Foi identificada uma ilha de patogenicidade na cepa clínica de *V. parahaemolyticus* O3:K6 e dois cromossomas circulares (3,3 e 1,9 Mbp) (MAKINO et al., 2003). Ambos os cromossomos contêm os genes essenciais para o crescimento e viabilidade, entretanto a maioria destes genes está localizada no cromossomo maior. A ilha de patogenicidade, localizada no cromossomo menor, abriga genes *tdh* e outros genes associados com a virulência (TAMAGORI et al., 2002; NUÑEZ et al., 2009).

2.5.2 *Vibrio vulnificus*

De acordo com Hollis et al. (1976), *V. vulnificus* foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1964 e foi inicialmente identificado como uma cepa virulenta de *V. parahaemolyticus*. Somente em 1970 este micro-organismo foi reconhecido como uma nova espécie, devido o surgimento de casos de septicemia veiculada por alimentos e infecções de feridas apresentando características distintas das outras espécies de *Vibrio* (CERDAS-CUÉLLAR et al., 2001).

Vibrio vulnificus é habitante natural do ambiente marinho e sua presença não está associada à poluição ou a qualquer outra forma de contaminação (STROM; PARANJPYE, 2000). Por essa razão, a detecção e enumeração dessa bactéria no ambiente tem sido prioridade das agências responsáveis pela garantia sanitária dos produtos marinhos (HARWOOD et al., 2004).

A infecção com *V. vulnificus* ocorre geralmente pela ingestão de moluscos contaminados, ou por contaminação das feridas preexistentes com água do mar ou mariscos, podendo levar ao quadro de septicemia (KIM et al., 2008; JONES et al., 2009; CHEN et al., 2010).

Os fatores predisponentes, tais como doenças do fígado e comprometimento do estado imunológico, desempenham um papel importante no desenvolvimento de septicemia, enquanto infecções de feridas e gastroenterite parecem ser correlacionadas com condições médicas preexistentes (CHEN et al., 2010). Diferentemente das demais espécies patogênicas de *Vibrio*, o *V. vulnificus* invade e se multiplica na corrente sanguínea, ocorrendo óbito em 40 a 60% dos pacientes com disfunção hepática. Pacientes com síndromes que levam ao aumento de deposição de ferro como cirrose crônica, talassemia major, hepatite, hemocromatose e consumo de álcool excessivo também estão mais suscetíveis as septicemias por *V. vulnificus*. (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Vibrio vulnificus é fenotipicamente similar ao *V. parahaemolyticus*, apresentando características bioquímicas semelhantes como lisina e ornitina descarboxilase positiva e arginina deidrolase negativa. A diferenciação entre estes dois micro-organismos é baseada na capacidade de *V. vulnificus* fermentar a lactose, o que também o diferencia de outros membros do gênero, onde a maioria das cepas é ONPG (orto-nitrofenil beta galactosidase) positivas e fermentadoras de lactose (TAMPLIN, 2001; KONEMAN et al., 2008). A maioria das cepas de *V. vulnificus* não fermenta a sacarose, formando, portanto colônias verdes em Agar TCBS (Tiosulfato-citrato-bile-sal-sacarose), o qual é utilizado para o isolamento e diferenciação de espécies de *Vibrio* (HARWOOD et al., 2004). No entanto, sabe-se que uma pequena porcentagem (3-15%) de cepas de *V. vulnificus* pode fermentar a sacarose, formando colônias amarelas neste meio de cultura (ABBOTT et al., 2007).

Apresenta distribuição cosmopolita ocorrendo principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, onde a temperatura das águas oscila entre 9 e 31°C. A proliferação desta espécie é maior quando a temperatura da água é acima de 18°C. Em temperaturas mais baixas, menores que 10°C, estes organismos ficam em estado VNC (OLIVER; KAPER, 1997; MORENO; LANDGRAF, 1998). Dados da literatura relatam à sobrevivência de cepas de *V. vulnificus* em ostras cruas mantidas a temperatura de - 20°C. (OLIVER; KAPER, 1997; BRYAN et al., 1999; STROM; PARANJPYE, 2000).

A frequência das infecções por *V. vulnificus* é maior nos meses de verão e a variação sazonal favorece seu crescimento em ambientes aquáticos onde a temperatura é alta e a salinidade baixa (HEELAY et al., 2002).

Uma característica marcante de *V. vulnificus* é seu potencial patogênico ao homem com grande capacidade de invasão e letalidade. É responsável por mortes relacionadas ao consumo de alimentos marinhos nos Estados Unidos, sendo o consumo de moluscos bivalves, *in natura* ou parcialmente cozidos, as principais causas de gastroenterite (OLIVER; KAPER,

1997, COOK, 1997; FRANCO; LANDGRAF, 2003; YANO et al., 2004; PEREIRA et al., 2007; CHEN et al., 2010). No entanto, este micro-organismo não tem sido incriminado como agente causal de surtos, sendo responsável por casos isolados da doença em cerca de 1% (CERDÀ-CUÉLLAR, et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2001).

As infecções de feridas podem ocorrer em indivíduos saudáveis havendo contaminação de uma lesão prévia com a bactéria, ou em lesões adquiridas em ambiente de estuário (CALIF, et al., 2002; PFEFFER, et al., 2003; KIM et al., 2008; CHEN et al., 2010).

Esta bactéria pode entrar no organismo através de lesões na epiderme, gerando dor intensa e edema local, podendo em alguns casos levar a amputação do membro afetado. Os indivíduos afetados apresentam lesões secundárias bulbosas da pele, as quais são cheias de fluido hemorrágico e que podem formar úlceras necróticas ou gangrenosas. As lesões na pele são rapidamente progressivas e tipicamente confinadas a região subcutânea. As extremidades que exibem estas lesões são geralmente inflamadas e doloridas devido à abertura vascular. (HALOW et al., 1996; VOLLBERG; HERRERA, 1997).

Este patógeno possui relevância na saúde de pescadores e manipuladores de mexilhões, visto que as valvas destes moluscos podem ocasionar ferimentos durante sua manipulação e os ferimentos podem ser infectados por este micro-organismo, causando uma grave infecção local.

Tanto na septicemia quanto na infecção de feridas nota-se uma replicação rápida da bactéria nos tecidos do hospedeiro com danos extensivos do tecido da pele. De fato, a morte pode ocorrer em 24 horas após o contato com a bactéria (STROM; PARANJYPE, 2000). Mesmo com tratamento, as taxas de mortalidade por septicemia podem ser maiores que 75% e para infecções em feridas maiores que 50% (GULIG et al., 2005; JONES et al., 2009).

A compreensão da patogênese molecular da interação entre patógeno e hospedeiro é fundamental para elucidar como *Vibrio vulnificus* pode contornar as defesas do hospedeiro, se multiplicar e causar infecção. A infecção por *V. Vulnificus* é invasiva, observando dano tecidual grave com progressão fulminante. A patogenicidade da bactéria é multifatorial e um processo complexo que envolve o produto de muitos genes (LEE et al., 2007).

V. vulnificus produz diversos produtos extracelulares como hemolisina, citolisina, protease, elastase, fosfolipase e sideróforos, os quais são responsáveis pela rápida degradação do tecido muscular durante a infecção, atuando como fatores de virulência (HUSS et al., 2004; GULIG et al., 2005; PARK et al., 2006; LEE et al., 2007).

A presença de uma exotoxina hemolisina-citolisina tem sido relatada como um marcador de virulência de *Vibrio vulnificus*, a qual é codificada pelo gene *cth* (CAMPBELL et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2003; PFEFFER et al., 2003; PANICKER et al., 2004; DRAKE et al., 2007) (outras designações para este gene é *vvh* e *hha*) (DRAKE et al., 2007). Trata-se de uma exotoxina termo-lábil que possui a capacidade de lisar os eritrócitos de mamíferos e é citotóxica a cultura de tecidos de mamíferos (STROM & PARANJPYE, 2000).

As proteases apresentam atividades de elastase e colagenase, que podem ser responsáveis pela extensa necrose de tecido local, observadas durante as infecções de feridas. A presença da cápsula polissacarídica é essencial para provocar o processo infeccioso e confere resistência contra os efeitos bactericidas do soro e fagocitose por macrófagos (MIYOSHI, et al., 1994; OLIVER; KAPER, 1997; MORENO; LANDGRAF, 1998;

WANG et al., 2008). Segundo Horré et al. (1996) a análise da composição da cápsula de cepas de *V. vulnificus* revelou a existência de mais de um tipo antigênico. Os tipos capsulares 1 e 2 estão relacionados a cepas isoladas de espécimes clínicos e os outros tipos de cápsula foram reconhecidos em amostras de água do mar e animais marinhos.

Três diferentes biotipos de *V. vulnificus* foram identificados. Aproximadamente 85% das cepas isoladas de amostras clínicas pertencem ao biotipo 1, enquanto o biotipo 2 provoca infecções em enguias. O biotipo 3 foi identificado e está associado com bacteremia veiculada

a alimentos de origem marinha. Estes biótipos foram estabelecidos baseados em características bioquímicas, como produção de indol, descarboxilação da ornitina e crescimento a 42°C. No entanto, esta classificação, originalmente estabelecida em 1982, tende a ser substituída por sorovares (STROM; PARANJPYE, 2000; CERDÀ-CUÉLLAR, et al., 2001; LEE et al., 2005).

Além de estar associado a infecções em humanos, Høi et al. (1998) e DePaola et al. (1997) relatam a presença deste micro-organismo no intestino de peixes e na água do mar.

Diante do potencial patogênico invasivo de *Vibrio vulnificus*, um diagnóstico rápido, preciso e adequado é essencial para a redução da mortalidade das infecções. Nos últimos anos, a detecção deste micro-organismo a partir de amostras de frutos do mar e da análise da água do ambiente marinho tem sido feita através da detecção do gene *ctx*, o qual é encontrado nas cepas de *Vibrio vulnificus* (CAMPBELL et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2003; PFEFFER et al., 2003; PANICKER et al., 2004; KIM et al., 2008).

2.5.3 *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus é uma bactéria presente no ambiente marinho e pode ser isolada a partir de moluscos bivalves. Foi relatada a presença de *V. alginolyticus* em surtos epizooticos em cultivos no Mediterrâneo, causando mortalidade do pescado, danos em moluscos e crustáceos, e importantes perdas econômicas (BALEBONA et al., 1998; HÖRMANSDORFER et al., 2000).

Este micro-organismo foi originalmente classificado como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*. Esta bactéria não está associada a casos de gastroenterite e, portanto, tem sido reconhecida como micro-organismo oportunista cujo isolamento é maior a partir de infecções extra-intestinais como nos casos de infecções superficiais, otites e conjuntivites em pacientes expostos ao ambiente marinho contaminado. Embora a infecção, na maioria das vezes, seja autolimitante, indivíduos imunodeprimidos são bastante suscetíveis a esse patógeno (LOPES, 1993; CHIEN et al., 2002; JAKSIÉ et al., 2002). Durante períodos de clima quente, *V. alginolyticus* pode alcançar concentrações no mexilhão suficiente para causar doença em humanos (RIPABELLI et al., 2002).

2.5.4 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae foi descrito e nomeado por Paccini em 1854 e isolado por Robert Koch em 1884, recebendo o nome de “Kommabacillus” devido ao característico aspecto curvo das células bacterianas. É o responsável por causar epidemias e pandemias de cólera desde 1817. As cepas podem ser divididas de acordo com as diferenças na composição da parede celular (antígeno somático O) que classifica o grupo em mais de 200 sorogrupos diferentes. Todas as cepas apresentam um antígeno flagelar comum (H). Na década de 30 descobriu-se que as cepas pandêmicas eram aglutinadas por um único anti-soro, denominado O1. As cepas de *V. cholerae* O1 podem ser divididas em três sorogrupos: Inaba, Ogawa e Hikogima. A identificação desses sorogrupos possui importância para estudos epidemiológicos (COLWELL, 1996). As cepas epidêmicas do sorovar O1 podem ou não produzir toxinas e dividem-se em biovar clássico e em biovar El Tor, sendo esta última um biótipo de *V. cholerae* altamente hemolítico e o responsável pela maioria dos surtos de cólera (BRAVO et al., 1998).

Até o momento foram registradas sete pandemias de cólera na história, sendo as três últimas causadas por *V. cholerae* sorogrupo O1. A sétima pandemia iniciou-se em 1961, quando o *Vibrio cholerae*, biotipo El Tor, ultrapassou os limites de uma área endêmica em Célebes, Indonésia, e estendeu-se a outros países da Ásia Oriental. Reforçada pelos deslocamentos da população, através dos movimentos migratórios, a pandemia chegou a

Bangladesh no final de 1963, à Índia em 1964, e à União Soviética, Irã e Iraque em 1965 e 1966 (NARCKEVICH et al., 1993). Em 1970, a cólera invadiu a África Ocidental e se dispersou rapidamente ao longo da costa e das vias fluviais, onde a doença é endêmica, especialmente nas zonas costeiras, onde a temperatura, pluviosidade e densidade populacional contribuem para a sua persistência (GLASS et al., 1991). Nos anos seguintes, a cólera atingiu alguns países industrializados, mas a eficiência dos serviços de saúde, do sistema de vigilância epidemiológica e, sobretudo das condições de saneamento ambiental não permitiram a sua instalação (TOLEDO, 1993).

A cólera foi introduzida na América Latina através do litoral peruano, atingindo posteriormente o Brasil e outros países da América do Sul. No decorrer de 1991, a cólera espalhou-se pelo continente americano, atingindo 14 países, com 391.734 casos confirmados e causando 4.002 óbitos. Em 1992, 20 países notificaram 352.300 casos e 2.399 óbitos; em 1993, 20 países notificaram 204.547 casos e 2.362 óbitos; em 1994, 15 países notificaram 12.612 casos e 1.229 óbitos (WHO, 1994).

A introdução da cólera no Brasil ocorreu pela floresta Amazônica, no Alto Solimões, alastrando-se progressivamente pela região Norte, seguindo o curso do Rio Solimões/Amazonas e seus afluentes, principal via de deslocamento de pessoas na região, e no ano seguinte para as regiões Nordeste e Sudeste através dos principais eixos rodoviários. Atualmente o comportamento da cólera sugere um padrão endêmico, definido pela ocorrência regular de casos e flutuações cíclicas de maior ou menor gravidade, na dependência de condições locais que favoreçam a circulação do *Vibrio cholerae* (MAGALHÃES et al., 1992).

O reservatório comprovado da cólera é o homem. No entanto, a presença desse micro-organismo no habitat aquático e sua associação à quitina de copépodes, zooplânctons e peixes, podem favorecer a contaminação dos moluscos bivalves durante o processo de filtração da água (CALIXTO, 2010).

Durante a expansão da sétima pandemia de cólera na América Latina e Caribe, o consumo de ostras e pescados crus foi considerado como de alto risco de transmitir essa doença. Produtos crus que entram em contato com águas contaminadas por fezes humanas podem ser veiculadores dessa doença e de outros agentes patogênicos fecais, além da recontaminação de produtos cozidos e da própria água de consumo não tratada (WHO, 1997).

A infecção intestinal por *Vibrio cholerae* resulta na perda de grande quantidade de água através das fezes, levando a uma rápida e progressiva desidratação. A toxina colérica estimula a secreção de fluidos ricos em sódio, bicarbonato e potássio, em volumes superiores à capacidade de absorção do intestino. Estima-se que a dose infectante para causar a doença seja de aproximadamente um bilhão de células de *V. cholerae* (SACK et al., 2004).

Sorogrupos não O1 do *Vibrio cholerae* já foram identificados em todo mundo, sabendo-se que os mesmos podem ocasionar patologias extra-intestinais, diarreias com desidratação severa semelhante à cólera. O *Vibrio cholerae* O 139 foi o primeiro *Vibrio cholerae* não O1 identificado como responsável por considerável mortalidade. As enterotoxinas elaboradas são similares para o grupo e ocasionam quadros clínicos muito semelhantes. A resistência do biotipo El Tor é maior, o que lhe dá condições de sobreviver por mais tempo no meio ambiente, crescer melhor e mais rápido em meios de cultura, além de lhe conferir menor suscetibilidade aos agentes químicos e maior tendência à endemização (BLAKE, 1993).

2.5.5 Outras espécies de *Vibrio*

Vibrio carchariae, espécie isolada de tubarões, é considerado como parte da microbiota normal, porém pode determinar quadro patológico quando o animal está sob estresse. A infecção humana pode ocorrer resultante de acidente com mordedura por este

animal, o que levanta a possibilidade de que a capacidade de agressão ocorra em condições oportunistas. Estudos realizados em algumas espécies de peixes de cultivo o apontam como agente etiológico de infecções. Trata-se de uma espécie presente em ambientes aquáticos, mas somente há alguns anos foi isolada, a partir de uma infecção humana extra-intestinal (LEE et al., 2002). *Vibrio carchariae* é fenotipicamente similar ao *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* diferenciando-se destes pela ausência de hidrólise de gelatina a 22°C, motilidade negativa a 36°C e reação de ornitina descarboxilase negativa (LOPES, 1993, YII et al., 1997, NICOLAS et al., 2002).

Vibrio anguillarum é responsável por provocar uma septicemia hemorrágica fatal em peixes marinhos (KENT et al., 2002; WEBER et al., 2010).

Infecções por *Vibrio damsela* são raras e poucos são os dados presentes na literatura. É responsável por produzir infecções de feridas ao homem, principalmente após a exposição à água do mar (TANG; WONG, 1999; SCOGLIO et al., 2001).

Vibrio cincinnatiensis foi isolado do líquido cefalorraquidiano de um paciente com 70 anos com bacteremia e meningite. No entanto, seu isolamento não é frequente.

Vibrio fluvialis foi isolado a partir de pacientes com quadros de diarreia. Esta espécie foi isolada em coproculturas de mais de 500 pacientes com diarreia em Bangladesh, em 1976, devido o consumo de ostras *in natura*. Nos Estados Unidos, o micro-organismo foi isolado de ferida de um paciente do Havaí, da água e sedimentos da baía de Nova York e de mariscos de Louisiana (VARGHESE et al., 1996; MAUGERI et al., 2000; HEIDELBERG et al., 2002; CAVALLO; STABILI, 2002). Trata-se de um patógeno entérico capaz de produzir hemolisina extracelular (KOTHARY et al., 2003). No Brasil, o primeiro caso de infecção por *V. fluvialis* foi descrito por Magalhães et al. (1996). Recentemente, este micro-organismo tem sido associado a casos de diarreia severa em pacientes imunocomprometidos ou crianças, podendo o quadro evoluir para bacteremia (LESMANA et al., 2002; HUANG et al., 2005; LAI et al., 2006).

Vibrio furnissii, antes denominado *V. fluvialis* biogrupo 2 foi isolado de pacientes com gastroenterite aguda durante dois surtos de envenenamento por alimentos e de fezes de um lactente de 1 mês de idade (MAGALHÃES et al., 1996; CHAKRABORTY et al., 1997).

Vibrio hollisae foi isolado de amostras de fezes de pessoas com diarreia após a ingestão de frutos do mar crus. Os sintomas comuns a todos os pacientes foram dor abdominal e leucocitose. Foram relatados casos raros de infecção sistêmica produzida por este micro-organismo, sendo a maioria pacientes com imunodeficiência. Alguns estudos apontam a presença de uma hemolisina semelhante à TDH do *V. parahaemolyticus* que seria responsável pela sua patogenicidade, paralelamente a uma enterotoxina sensível ao calor (CARNAHAN et al., 1994; LESMANA et al., 2002).

Vibrio ordalii tem sido associado como uma das principais causas de vibriose em salmonídeos marinhos. Os locais onde são observadas alterações histopatológicas após infecção com este micro-organismo são o músculo esquelético e cardíaco e as guelras (NAKA et al., 2011).

Vibrio vulnificus, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahemolyticus* e *V. harveyi* têm sido reportadas como as principais espécies do gênero *Vibrio* que representam risco para o cultivo de camarões. Da mesma forma, espécies como *V. anguillarum*, *V. tapetis* e *V. harveyi* são responsáveis por causar infecções em pescado. *V. anguillarum* é responsável por causar septicemia hemorrágica em peixes. Os peixes infectados apresentam descoloração da pele e eritema ao redor das barbatanas, guelras e boca. Sua taxa mortalidade em uma fazenda de peixes infectados gira em torno de 30 a 100% (LIGHTNER, 1996; DENKIN; NELSON, 2004; CROSA et al., 2006; HONG et al., 2007)

2.6 Características Genotípicas e sua Utilização na Identificação de *Vibrio* spp.

O gênero *Vibrio* é composto por aproximadamente 270 espécies incluindo patogênicas e não patogênicas. Uma acurada identificação fenotípica de espécies de *Vibrio* é problemática, principalmente devido à grande variabilidade em suas características bioquímicas (THOMPSON et al., 2004; TARR et al., 2007). Um erro comum na identificação envolve *Aeromonas caviae* muitas vezes identificada como *Vibrio fluvialis* (ABBOTT et al., 1998). Além disso, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* podem ser confundidas com *Vibrio* quando uma bateria completa de testes bioquímicos não é executada (KWOK et al., 2002). Diante deste fato, métodos moleculares, os quais são mais rápidos, sensíveis e específicos se tornam necessários para a identificação do gênero *Vibrio* e suas espécies.

A literatura relata a detecção de genes alvos como os genes da subunidade RNA polimerase (*rpoA* e *rpoB*), o qual é encontrado em todas as cepas de *Vibrio* (TARR et al., 2007; DALMASSO et al., 2009). A utilização desta técnica permite uma identificação segura do gênero *Vibrio* independente de suas características fenotípicas, sorotipos e virulência. Além disso, a detecção do gênero *rpoA* apresenta vantagens pelo fato de ser altamente conservado entre o gênero *Vibrio* (DALMASSO et al., 2009) e por ser amplamente sequenciado nos casos de estudos filogenéticos e identificação de espécies (THOMPSON et al., 2005).

Para a identificação genotípica de *Vibrio parahaemolyticus* pode-se detectar a hemolisina termolábil através da presença do gene *tlh*, o qual é encontrado em todos os isolados clínicos e ambientais de *V. parahaemolyticus* e não está associado com a virulência bacteriana (BLACKSTONE et al., 2003; NORDSTROM et al., 2007; ROJAS et al., 2009; ROJAS et al., 2011). Além disso, genes de virulência como *tdh* e *trh* podem ser detectados em cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus* (ROJAS et al., 2011).

Em *Vibrio vulnificus* o gene da hemolisina (*cth*) é considerado um marcador específico para esta espécie (LEE et al., 2003; PANICKER et al., 2004; KIM et al., 2010).

2.7 Gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* é constituído por bastonetes Gram-negativos, podendo ou não ser móveis por flagelos polares, não esporulados, fermentadores, anaeróbios facultativos e que apresentam reação de oxidase, característica que o distingue das Enterobacteriaceae. Apesar deste gênero ser conhecido como patógeno de peixes desde 1894 (KIRKAN et al., 2003) a sua classificação taxonômica só foi estabelecida recentemente. Inicialmente o gênero *Aeromonas* era considerado pertencente à família Vibrionaceae, no entanto, com avanço das técnicas moleculares, surgiu-se a criação da família Aeromonadaceae, da qual o gênero *Aeromonas* faz parte (GRANUM et al., 1998; ABBOT et al., 2003; MATTÉ, 2004; ØRMEN et al., 2005). Atualmente são reconhecidas 14 espécies de *Aeromonas* por meio de características bioquímicas e análise de DNA (ØRMEN et al., 2005).

Os micro-organismos do gênero *Aeromonas* não são relacionados a condições sanitárias inadequadas por não terem correlação com micro-organismos indicadores de contaminação fecal. Segundo Brasil (2001), a pesquisa de *Aeromonas* spp. não é um parâmetro de qualidade microbiológica considerada pela legislação brasileira, porém diversos estudos têm demonstrado espécies patogênicas relacionadas a alimentos (VILLARI et al., 2003). As bactérias do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídas pelo ambiente aquático, sendo isolados de peixes, ostras, camarões e mexilhões. Apesar destes micro-organismos terem sido isolados e identificados primeiramente de águas marinhas e salobras, a literatura relata o isolamento de *Aeromonas* de água potável destinada ao abastecimento público (SEN; RODGERS, 2004; PAVLOV et al., 2004) e água mineral engarrafada,

evidenciando sua importância para a Saúde Pública (VILLARI et al., 2003; PIANETTI et al., 2005; VENIERI et al., 2006). Apesar do predomínio em alimentos de origem aquática, ocorre também uma alta incidência de diversas espécies de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem não aquática como vegetais, carne vermelha e de aves representando um alerta para a saúde pública no que se refere a vigilância sanitária. Também podem ser isolados de carnes bovinas e suínas, leite cru, vegetais e saladas (HARF-MONTEL et al., 2004; SZCZUKA; KAZNOWSKI, 2004).

Em humanos, as espécies de *Aeromonas* são responsáveis por gastroenterites, caracterizando-se por diarreia aguda, aquosa autolimitada, de curta duração, podendo ser acompanhada de febre, vômitos e dor epigástrica assemelhando-se à síndrome causada por *V. cholerae* O1. Manifestações extraintestinais como infecções cutâneas, hepatobiliares, urinárias, oculares, endocardites, osteomielites, bacteremias, e celulite ou infecção de feridas em manipuladores de alimentos ou profissionais de sistemas de aquicultura tem sido associada a presença de *Aeromonas*. Casos mais graves podem ocorrer em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico ou distúrbios hepatobiliares. (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; SZCZUKA; KAZNOWSKI, 2004). Segundo Kingombe et al. (2004), apesar do aumento de trabalhos evidenciando este gênero, poucos relatos de surtos foram evidenciados, provavelmente devido à inexistência de um método simples e rápido padronizado para sua identificação.

2.8 Enterobactérias

A família Enterobacteriaceae é constituída por bastonetes Gram-negativos geralmente associados às infecções intestinais, podendo ser encontrada nos mais diversificados ambientes. Os membros desta família são importantes patógenos humanos que podem causar desde uma gastroenterite leve a severa aos mais variados tipos de infecção tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites e septicemia (MORELLI et al., 2003).

Gêneros como, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* fazem parte da família Enterobacteriaceae (KONEMAN et al., 2008).

A presença de *E. coli* é relatada particularmente em infecções gastroentéricas, tanto em indivíduos imunocomprometidos, como em indivíduos sadios após a ingestão de alimentos contaminados, principalmente de moluscos bivalves sem prévia cocção. Sua presença em alimentos indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênicas insatisfatórias (BRASIL, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003). Além de *E. coli*, a presença de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Shigella* estão associados a quadros gastroentéricos humanos (MORELLI et al., 2003).

O gênero *Salmonella* é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato intestinal de pássaros e répteis seus principais reservatórios. Podem alcançar o ambiente aquático através de contaminação fecal e então, serem detectadas em peixes e produtos pesqueiros. As aves têm importante papel na transmissão do patógeno, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente salmonelas pelas fezes. As infecções causadas por *Salmonella* spp. podem decorrer da ingestão de carnes, principalmente mal cozidas ou cruas, ovos, leite cru e hortaliças contaminados (GERMANO; GERNMANO, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2003; VIEIRA et al., 2004). A presença de *Salmonella* em alimentos indica inadequação do produto para o consumo, constituindo um sério problema para a saúde pública (ANVISA, 2001).

A transmissão das enterobactérias no geral se dá por via fecal-oral, na maioria das vezes, através de alimentos contaminados por portadores, durante o processo de preparação e manipulação (FRANCO; LANDGRAF, 2003; VIEIRA et al., 2004). A água também pode ser

um veículo de transmissão, podendo ser contaminada no próprio manancial, por ser tratada inadequadamente ou ainda por contaminação na rede de distribuição (MACEDO, 2007).

Os principais sintomas de infecção por enterobactérias são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, sudorese e febre (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Tradicionalmente, dentro da família Enterobacteriaceae, as bactérias do grupo coliforme têm sido consideradas como indicadores de poluição fecal em águas (VIEIRA et al., 2004). A pesquisa de coliformes reflete a condição geral de higiene durante o processo de produção.

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por micro-organismos patogênicos. A presença de *E. coli* em água ou alimento indica contaminação de origem fecal e um possível risco à saúde.

Em geral, a maioria dos países, incluindo o Brasil, submete a liberação do consumo de mexilhões aos resultados da análise dos níveis de coliformes totais e termotolerantes presentes no ambiente. No entanto, há grande diversidade de critérios quanto aos níveis de coliformes termotolerantes permitidos tanto na água de cultivo quanto na carne do mexilhão no mundo.

A ANVISA, através da RDC 12/2001, dispõe que os moluscos bivalves resfriados ou congelados devem ter no máximo 50 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes a 45° C/g (50 UFC/100g). No México, por outro lado, a legislação para coliformes termotolerantes presentes na carne dos mexilhões é bem mais restritiva e prevê no máximo 230 UFC/100g. No Canadá, a legislação referente aos coliformes fecais na carne dos mexilhões é ainda mais rigorosa, permitindo apenas 170 UFC/100g (PEREIRA, 2003).

De igual modo, para a análise de coliformes termotolerantes na água de cultivo de mexilhões, cada país institui seus padrões para a quantidade de coliformes permitidos. Nos Estados Unidos, a liberação de áreas consideradas livres para cultivo de mexilhões é efetuada levando-se em consideração o número máximo de coliformes termotolerantes presentes na água, que não deverá ultrapassar 88 UFC/100mL de água salgada. No Canadá, a legislação prevê como áreas livres para cultivo de moluscos, o número máximo de coliformes termotolerantes em 43 UFC /100mL de água salgada. No México, as águas livres para cultivo para mexilhões serão liberadas apenas quando tiverem no máximo 14 UFC coliformes termotolerantes/100mL de água salgada.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão que estabelece a classificação e normaliza os parâmetros de qualidade da água, através da resolução 357 de 2005, determina que o número de coliformes termotolerantes na água salobra ou salina, destinadas a atividades de aquicultura e pesca, não ultrapasse 14 NMP/100ml, com não mais de 10% das amostras excedendo 43 coliformes NMP/100ml. Em áreas onde o NMP alcança 70-700 é indispensável o tratamento dos moluscos através da depuração (CONAMA, 2005).

2.9 Resistência Antimicrobiana

A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo importantes na redução da morbidade e mortalidade por doenças infecciosas. No entanto, foram detectadas cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos logo após o seu lançamento.

O crescimento da resistência aos antimicrobianos é multifatorial, decorrente do aumento da pressão de seleção positiva no meio através do uso indiscriminado destes tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária e, também, por práticas usadas na agricultura. A literatura relata que logo após a introdução dos antibióticos no tratamento médico em 1940, estes foram introduzidos em criações animais como profiláticos e promotores de crescimento para melhorar a eficiência ou utilização alimentar, sincronizar ou

controlar o ciclo reprodutivo, o desempenho no cruzamento e aumentar a aceitação do consumidor ao produto final (OLIVEIRA, 2008).

Os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate de doenças em animais aquáticos cultivados, no entanto, o uso indiscriminado na aquicultura pode acarretar problemas de saúde pública, como a possível toxicidade de algum antimicrobiano aos manuseadores dos animais, modificação da microbiota dos consumidores e transferência da resistência ao antimicrobiano a patógenos humanos o que pode dificultar o tratamento das doenças no homem (VIEIRA et al., 2000). O emprego de antibióticos no tratamento de patologias bacterianas na aquicultura mostra-se limitado devido o possível desenvolvimento de cepas resistentes, alterando a microbiota das áreas afetadas. Isto pode refletir em alterações significativas sobre a população de outros organismos aquáticos, como as algas, alterando desta forma o equilíbrio ecológico (HERNANDEZ et al., 2005).

O uso indiscriminado de antibióticos em populações animais tem sido motivo de preocupação na comunidade acadêmica, em virtude do aumento da circulação de bactérias patogênicas resistentes entre animais e humanos (MENDES et al., 2004). Embora o tratamento com antibióticos seja, talvez, a maneira mais rápida de se obter resposta a uma doença bacteriana na aquicultura, por outro lado pode acarretar em graves problemas, pois podem induzir resistência quando utilizadas tanto em baixas doses, como também em doses elevadas. Logo, alternativas buscando a antibioticoterapia planejada e a adoção de medidas de manejo sanitário são importantes para reduzir os riscos aos seres humanos e ao meio ambiente (CABELLO et al. 2006).

A resistência antimicrobiana pode estar associada a diversos fatores como o lançamento de esgoto doméstico e industrial, inclusive da área farmacêutica, diretamente no ambiente aquático, pela deposição de quimioterápicos no lixo comum e também pelo uso de antibióticos, seja pela administração de doses subterapêuticas ou sua utilização como promotores de crescimento em animais de produção (SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003).

Na década de 90, a maioria dos países europeus banuiu o uso de antimicrobianos como a penicilina e a tetraciclina como promotores de crescimento de animais de produção (gado de corte e outros), no entanto, países como os Estados Unidos e muitos países da América Latina não procederam da mesma maneira o que pode estar relacionado aos inúmeros problemas gerados pela resistência bacteriana a estes fármacos (AARESTRUP, 2001; OMS, 2001).

Países desenvolvidos como os membros da União Européia e Canadá foram os países que mais notificaram na Organização Mundial do Comércio, as restrições na compra de determinados produtos que continham um nível acima dos limites máximos de resíduos impostos pelos mesmos. A maioria dessas imposições muitas vezes torna o comércio inviável ou até restringe o acesso dos países em desenvolvimento ao comércio internacional (RIMAL et al., 2001).

A persistência de resíduos antimicrobianos em alimentos varia com o produto e depende de uma série de variáveis, tais como a dose, a via de administração, a solubilidade e o estado de saúde do animal (COSTA, 2002).

Resíduos de antibióticos como a penicilina, terramicina, cloranfenicol e estreptomicinas tem sido encontrado em alimentos. Antibióticos como cloranfenicol, à sulfametazina e os nitrofuranos possuem ação carcinogênica (COSTA, 2002). Os resíduos de penicilina constituem uma grande preocupação com relação aos riscos oferecidos aos humanos devido à alta porcentagem de pessoas alérgicas a este fármaco (FONSECA; SANTOS, 2000). Em humanos, o cloranfenicol pode causar efeitos colaterais adversos como anemia aplásica e hipoplásica, granulocitopenias devido à sua ação sobre células da medula óssea após o uso de níveis terapêuticos ou profiláticos (BOOTH, 1992). A tetraciclina, ao se ligar ao cálcio pode resultar na inibição do desenvolvimento dos dentes e do crescimento ósseo, podendo os dentes tornar-se descolorados (BOOTH, 1992).

A resistência antimicrobiana frente a determinados antibióticos é um tipo de adaptação microbiana que pode causar doenças veiculadas por alimentos ainda mais graves. Cepas que eram suscetíveis a praticamente todos os agentes antimicrobianos durante décadas, atualmente têm se mostrado resistentes não somente aos usados na terapêutica clássica, mas também a novos fármacos. Alguns micro-organismos desenvolveram resistência a múltiplos fármacos, sendo denominados multirresistentes (TAUXE, 2002). Esta resistência pode ocorrer de diferentes modos como bombas de efluxo, enzimas de inativação, impermeabilidade ao antimicrobiano ou por mudança no sítio-alvo do antibiótico. Estes mecanismos podem ser intrínsecos ou ocorrer pela aquisição de genes de resistência através de mutações cromossômicas ou por troca de material genético mediada por plasmídeos, transposons e integrons (PIDDOCK, 2006; PARTRIDGE et al., 2009).

Os micro-organismos patogênicos possuem capacidade adaptativa, o que permite sua sobrevivência no organismo hospedeiro e assim, são capazes de provocar infecção. A expressão dos fatores de resistência e virulência é regulada por determinadas condições, como o ambiente em que a bactéria se encontra (MAYER, 2010).

O gênero *Vibrio* apresenta versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. O repertório genético desta bactéria para adaptação a mudanças e ambientes hostis, foi demonstrado pelo surgimento de cepas que manifestaram mecanismos de resistência aos antimicrobianos logo após a introdução destes fármacos na prática clínica (THOMPSON et al., 2004).

Ahmed et al. (2004) relataram a presença de dois genes associados a resistência aos aminoglicosídeos em isolados de *Vibrio fluvialis*. O gene *aadA7* está relacionado com a resistência a estreptomicina e o gene *aac(3)-Id* confere resistência à gentamicina. Genes que codificam para a resistência a quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico) também foram detectados em *V. fluvialis* (SRINIVASAN et al., 2006). Durante um surto por *V. cholerae* O139, na Índia, foi detectado genes que conferem resistência a sulfametoxazol, trimetoprim e estreptomicina.

Kim et al. (2007) ao avaliar a resistência a tetraciclina em 24 isolados de *Vibrio* spp. provenientes de diversas fontes marinhas relataram a presença dos genes *tet* (O) e *tet* (M) em 23 isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pontos de Coletas

Um dos pontos de coleta foi estabelecido no Arquipélago de Santana (Figura 1), em costões rochosos e próximos a cabos subaquáticos, localizado na Baía de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro a uma distância de aproximadamente 10 km da costa. Localiza-se na costa Leste de Macaé nas coordenadas $22^{\circ} 23' 45.43''$ S – $41^{\circ} 43' 42.52''$ W. A ilha de Santana é a maior com aproximadamente $1,29 \text{ km}^2$ de área e altura de 156 m no ponto mais alto e, é composto de três elevações. A ilha do Francês tem uma área aproximada de $0,35 \text{ km}^2$ e altura máxima em torno de 60 m. O Ilhote do Sul tem área de $0,12 \text{ km}^2$ e, altura máxima também de 60 m. Por ser o único arquipélago em todo o litoral da região é avistado a grandes distâncias. O arquipélago tem apenas duas praias, uma, maior, na parte noroeste da ilha de Santana e outra, bem menor, na parte oeste da ilha do Francês. Ambas são bem protegidas dos ventos e, por isso, mesmo propícias para banho, apresentando areias claras e água transparente é atualmente área de proteção ambiental (BELTRÃO, 1995). Foram realizadas três coletas, no período de junho de 2007 a maio de 2008.



Figura 1. Costão rochoso localizado no Arquipélago de Santana, Baía de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Os outros pontos de coletas foram estabelecidos em Angra dos Reis, na Baía da Ilha Grande, Praia do Leste (Figura 2) e em Arraial do Cabo (Figura 3). A Baía da Ilha Grande é caracterizada como um corpo de água salgada semiconfinada, com aproximadamente 800 km^2 de superfície, localizada na costa sul do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes $22^{\circ} 55' \text{ S}$ e $23^{\circ} 15' \text{ S}$ e longitudes $44^{\circ} 43' \text{ W}$ (SILVA, 2001). Segundo Signorini (1980), esta região sofre influência da convergência das águas oceânicas, que entram pelo lado oeste da Ilha Grande, com as águas vindas da Baía de Sepetiba (ao leste), caracterizando-se como ambiente estuarino. A fazenda de maricultura de Arraial do Cabo, cidade litorânea situada ao extremo

Leste do Estado do Rio de Janeiro, está localizada na praia do Forno, onde são cultivados mexilhões, ostras e vieiras nas coordenadas 22°56'31"S e 42°8'19"W.

Nestes pontos, os mexilhões foram coletados de fazendas de maricultura onde é empregado o sistema de *longline* para o cultivo desses animais. As coletas de mexilhões em Angra dos Reis foram realizadas em outubro de 2010 e fevereiro de 2011 e as coletas em Arraial do Cabo foram realizadas em maio e julho de 2011. Em cada ponto, Arraial do Cabo e Angra dos Reis, foi realizado duas coletas.



Figura 2: Sistema de cultivo de mexilhões em *longline*, localizado na Praia do Leste em Angra dos Reis, Baía da Ilha Grande, Brasil.



Figura 3: Sistema de cultivo de mexilhões em *longline*, localizado na Praia do Forno em Arraial do Cabo, Brasil.

3.2 Análise Microbiológica da Água do Mar

3.2.1 Amostragem

Foram utilizados potes de plásticos estéreis com capacidade para 1L de água. A coleta da água foi efetuada em 3 e 13 m de profundidade através de mergulho autônomo em dois pontos distintos em cada local de coleta. O estabelecimento dessas profundidades objetivou avaliar a possível interferência da coluna de água sobre a microbiota. Em Macaé, os pontos de coleta foram estabelecidos próximos a costões rochosos e em Angra dos Reis, na fazenda de maricultura. Já em Arraial do Cabo um ponto de coleta foi estabelecido na fazenda de maricultura e o outro ponto próximo a um restaurante flutuante que se localiza aproximadamente em torno de 500 m da fazenda de maricultura. Após a coleta o material foi mantido sobre refrigeração e transportado imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para realização da análise bacteriológica. O intervalo de tempo entre a coleta e processamento da amostra foi em torno de 6 horas.

3.2.2 Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Coliformes totais e termotolerantes foram enumerados utilizando-se o método do Número Mais Provável (NMP) conforme recomendações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

Para a pesquisa de coliformes totais foram inoculados volumes de 10 mL da amostra a ser analisada em uma série de 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST - Difco®) em concentração dupla; volumes de 1 mL da amostra na segunda série de 3 tubos contendo LST em concentração simples e volumes de 1 mL da diluição 10^{-1} na terceira série de 3 tubos contendo o mesmo meio. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. A suspeita de coliformes totais é indicada pela formação de gás nos tubos de Durham.

Para confirmação de coliformes totais, cada tubo de LST foi repicado em Caldo Verde Brilhante Bile 2% lactose (Difco®) e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás no tubo de Durham.

Para a pesquisa de coliformes termotolerantes, cada tubo positivo no caldo LST foi repicado em caldo *Escherichia coli* (EC - Difco®) e incubados tubos a 45°C ($44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$), por 24 a 48 horas. A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás no tubo de Durham.

A partir dos tubos que apresentaram resultados positivos no Caldo EC, indicados pela presença de gás, foram retiradas alíquotas para semeadura por estriamento, sobre a superfície do meio ágar Eosina Azul de Metileno- EMB (Difco®) e incubação a 37°C , por 24 horas. Após este período, foram isoladas duas a três colônias típicas de *E. coli* para o meio Agar Triptona de Soja-TSA (Difco®), cujo crescimento foi empregado para avaliar a produção de indol em meio de SIM (Vetec®), via metabolismo de utilização da glicose, pela reação de Vermelho de Metila e produção de acetoína pelo teste de Voges Proskauer (Difco®), e capacidade de utilização do Citrato (Micromed®) como fonte única de carbono, de acordo com Koneman et al. (2008). Como controle foram utilizadas cepas previamente identificadas pelo Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ.

3.3 Análise Microbiológica dos Mexilhões

3.3.1 Amostragem

Os mexilhões da espécie *Perna perna* foram coletados, em três diferentes momentos. Ao total, foram realizadas sete coletas, sendo três coletas em Macaé, no período de junho de 2007 a maio de 2008, duas coletas em Angra dos Reis em outubro de 2010 e fevereiro de

2011 e duas coletas em Arraial do Cabo em maio e julho de 2011. Em cada coleta, foram extraídos 2 lotes de 25 indivíduos adultos, apresentando as valvas fechadas e de tamanho utilizado para comercialização (maiores que 6 cm). Os animais foram extraídos diretamente do costão rochoso, em profundidades variando de 3 a 4 metros, através de mergulho autônomo. Tal procedimento foi realizado para evitar a coleta de animais em locais mais rasos, sujeitos a vazante de maré e, portanto mais expostos a variações de temperatura e incidência solar direta. Em seguida, estes organismos foram acondicionados em sacos de polietileno dentro de caixa de isopor contendo gelo e transportados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para realização da análise bacteriológica. O transporte dos mexilhões sob resfriamento teve como objetivo evitar a morte da maioria dos animais e o conseqüente crescimento de sua microbiota.

3.3.2 Processamento das amostras

Os lotes foram separados, adotando-se o mesmo procedimento para cada uma. Os mexilhões (Figura 4) foram lavados individualmente com auxílio de escova, sob água corrente potável, para a retirada de sujidades. Durante este processo, foram descartados os animais que apresentavam valvas abertas. Em capela de fluxo laminar, próximo ao bico de Bunsen, os mexilhões foram abertos assepticamente com bisturi estéril. A massa corpórea e o líquido intravalvar foram recolhidos em becher, onde foi realizada, com auxílio de pinça e bisturi esterilizados, a trituração das partes sólidas a fim de promover homogeneização do material. Para a pesquisa de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. foram pesados 25g da amostra e adicionados a 225 mL de água peptonada alcalina (APA) com 1% de NaCl. A partir desta diluição (10^{-1}), de cada amostra, foi tomada uma alíquota de 1mL e acrescentada em tubo contendo 9 mL de APA com 1% de NaCl (diluição 10^{-2}), e a outro com 9 mL de APA com 3% de NaCl (diluição 10^{-2}), sendo usados como meios de enriquecimento. Em seguida, estes foram incubados à 37°C por 12 a 24 horas. A pesquisa de enterobactérias seguiu basicamente a mesma metodologia utilizada para *Vibrio* spp. diferenciando-se apenas na não utilização de NaCl em APA. Após o crescimento em APA, as amostras foram semeadas em Agar EMB e MacConkey (FDA, 2004).



Figura 4. Mexilhão *Perna perna* com valvas abertas para processamento da massa corpórea e líquido intravalvar.

3.4 Pesquisa de Micro-organismos com Potencial Patogênico

3.4.1 Pesquisa de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp.

As amostras que apresentaram crescimento em APA com 1% e 3% de NaCl foram isoladas em Agar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose (TCBS-Oxoid®) acrescidas de 1%, 2% e 3% de NaCl, em duplicata e Agar Seletivo para Pseudomonas-Aeromonas (GSP-Micromed®) acrescido de 1% de NaCl, em duplicata. Todas as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. As crescentes concentrações de NaCl utilizadas em Agar TCBS tiveram como objetivo tornar este meio mais seletivo, favorecendo crescimento de bactérias com diferentes graus de halofilia (FDA, 2004).

Foram transferidas até 10 colônias isoladas de cada placa de TCBS (Figura 5), apresentando coloração amarela (sacarose positivo) ou verde (sacarose negativo) e colônias amarelas (amido positivo) isoladas do ágar GSP (Figura 6) para tubos contendo Agar Nutriente (Micromed®), LIA (Ágar Lisina Ferro-Micromed®) e Agar Kligler (Micromed®), todos acrescidos de 1% de NaCl e submetidos a incubação à 37°C por 24 horas para diferenciação presuntiva entre muitos *Vibrio* spp., e enterobactérias. Posteriormente a diferenciação entre estes micro-organismos foi realizada através da enzima citocromo oxidase, distinguindo *Vibrio* spp. dos membros de Enterobacteriaceae. A prova da oxidase foi realizada a partir do crescimento dos isolados em ágar nutriente inclinado contendo 1% de NaCl. Foi retirada uma alíquota com emprego da alça de platina e foram feitos esfregaços em fitas PROBAC® impregnadas com cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. O teste foi considerado positivo quando do aparecimento de uma coloração azul arroxeadado em 10 segundos. Essa prova é considerada positiva para os todos os membros da família Vibrionaceae (OLIVER; KAPER, 1997; FDA, 2004).

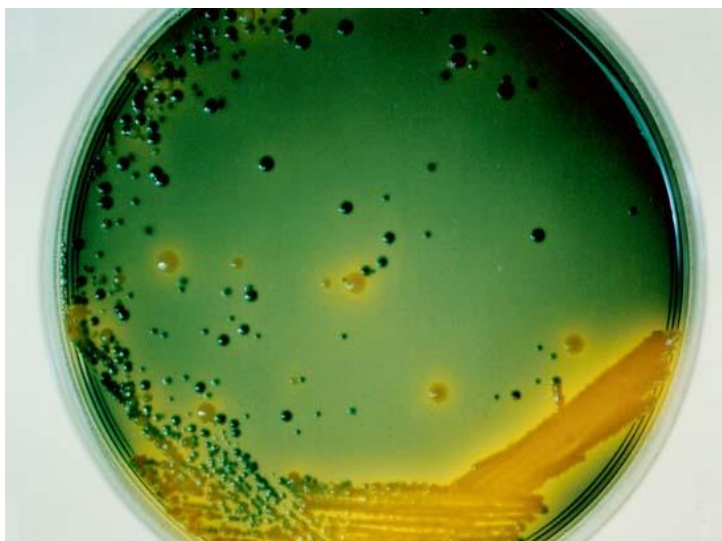


Figura 5. Crescimento de *Vibrio* spp. em ágar TCBS. Colônias amarelas: Sacarose positiva; colônias verdes: sacarose negativa.



Figura 6. Crescimento de *Vibrio* spp. em ágar GSP. Colônias rosas: Amido negativo.

3.4.1.1 Identificação fenotípica dos isolados

a) Prova de fermentação de açúcares

A fermentação de açúcares foi testada utilizando-se água peptonada acrescida de 1% de NaCl, 1% do açúcar em questão e 1% do Indicador de Andrade. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada através da coloração rosa após 24 horas de incubação na temperatura de 37°C. Os açúcares avaliados foram: glicose, manitol, lactose, sacarose, arabinose, celobiose, maltose e manose (Micromed®). Nos tubos de ensaio contendo a solução de glicose foram inseridos tubos de Durham para a observação da produção de gás, a qual caracteriza esta prova como positiva (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

b) Prova de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina

Para a realização das provas de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina, foi utilizada uma base contendo peptona, extrato de levedura, dextrose e púrpura de bromocresol, acrescida de 1% de NaCl, com a qual foram preparadas as soluções de lisina, arginina e ornitina (Micromed®). As soluções foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionada uma fina camada de óleo mineral à superfície do líquido, a fim de promover ambiente microaerófilo. Como controle, utilizou-se a solução base pura também acrescida de óleo mineral (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

Após a inoculação dos isolados e incubação à 37°C por até 7 dias, a leitura destas provas foi interpretada como negativa quando a coloração do meio apresentava-se amarela indicando acidez em ocasião da fermentação da glicose. Na reação positiva, ocorria fermentação do meio para ativação das enzimas de descarboxilação e posteriormente o meio virava para coloração violeta, indicando basicidade do meio em função da descarboxilação ou dehidrolização do aminoácido. A base usada como controle sempre apresentou resultado negativo (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

c) Avaliação da halofilia

Utilizando-se agulha bacteriológica os isolados foram inoculados em tubos com água peptonada alcalina com diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 6%, 8% e 10%) e incubados a 37°C por 24 horas. A turvação observada no tubo indicou o crescimento bacteriano, caracterizando o grau de halofilia do isolado testado (FDA, 2004).

d) Sensibilidade ao vibriostático O/129

Para este procedimento, os isolados foram inoculados em APA com 1% NaCl,

incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

Uma suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido ágar Müeller Hinton (MH - Micromed®) com 1% de NaCl com o auxílio da alça de Drigalski. Em cada placa semeada, foi depositado um disco de 6 mm de diâmetro impregnado com O/129 na dosagem de 10µg e outro na dosagem de 150µg, distantes entre si aproximadamente 4 cm, sendo todas as placas incubadas a 37°C por 12 a 24 horas. A leitura foi realizada através da observação do halo de sensibilidade ou crescimento bacteriano ao redor do disco de O/129, considerando o isolado como sensível ou resistente, respectivamente (JANDA et al., 1998).

e) Prova de ONPG (orto-nitrofenil beta galactosidase)

Este teste é utilizado para detecção da enzima galactosidase, utilizando-se discos de diferenciação de ONPG (Bacto®), recomendados para a detecção da presença desta enzima, objetivando a identificação de micro-organismos fermentadores tardios de lactose. A partir do crescimento em Ágar Kligler contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alçada de cada cultura e suspensa em 0,2 mL de solução salina (0,85% de NaCl) em tubo de ensaio. Cada tubo recebeu um disco de ONPG e após incubação à 37°C por 24 horas realizou-se a leitura. A reação positiva foi caracterizada pela coloração amarela na solução salina, oriunda da hidrólise do ONPG, pela liberação de ortonitrofenol (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

f) Provas de motilidade e produção de indol

Para as provas de motilidade e produção do indol, utilizou-se Agar sulfeto indol motilidade (SIM - Vetec®) acrescido de 1% de NaCl. Após inoculação em picada com auxílio de alça moldada em agulha, incubou-se a 35° por 24 a 48 horas. A interpretação do teste de motilidade foi realizada através da observação do tubo contra a luz sendo possível visualizar o tipo de crescimento da colônia, sendo considerado motilidade negativo o micro-organismo crescido apenas na linha inoculada e positivo o que ultrapassou a mesma. A leitura da produção de indol, resultada da degradação metabólica do aminoácido triptofano, foi realizada adicionando-se gotas de reativo de Kovacs (para-dimetilaminobenzaldeído em álcool) no tubo. A mudança de coloração do reativo de amarela para vermelha indica a presença de indol, sendo a prova considerada positiva (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

g) Prova de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM)

O caldo MR-VP (Vetec®) acrescido de 1% de NaCl apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato e é utilizado para a leitura da reação de VM-VP. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol, é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de 0,2 mL de α -naftol a 5% e 0,6 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas a 35°C. A prova do VM é utilizada para a detecção de ácidos mistos. É detectado através da viragem da coloração do caldo para vermelho após a adição do reativo vermelho de metila (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

h) Prova de redução de nitrato

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO_3). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 35°C e, uma gota de ácido sulfanílico e outra de α -naftilamina, reativos A e B de Griess Ilosway. A coloração rósea avermelhada indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

3.4.2 Pesquisa de enterobactérias

As amostras foram repicadas em meios seletivos e diferenciais como ágar Mac Conkey (MC) e Eosina Azul de Metileno. Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. As seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI), motilidade em tubo, produção do indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, hidrólise, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o micro-organismo envolvido (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi transferido 1 mL do crescimento em APA após 24 horas para 9 mL de Caldo Tetrionato (Vetec®) e incubados por 24h a 35°C. Após este período semeou-se por esgotamento, uma alçada do caldo em placas contendo Agar Salmonella-Shigella (SS-Merck®) e incubadas por 24h a 35°C (MAPA, 2008).

a) Comportamento em ágar kligler ferro

Este teste detecta a capacidade da bactéria fermentar a glicose ou a lactose. O ágar Kligler Ferro contém glicose em pequena concentração (0,1%), lactose em concentração superior (1%), o indicador de pH, vermelho de fenol, para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, tiosulfato de sódio, substrato para a produção de H₂S, e sulfato de ferro para a detecção desse produto final. É essencial que as culturas sejam observadas após 18 a 24 h de incubação para evitar que os hidratos de carbono sejam completamente utilizados e que ocorra degradação das peptonas, formando produtos finais alcalinos. É no bisel que se faz a leitura da lactose, no fundo do tubo a da glicose e no meio do tubo a de H₂S. Após incubação podem ser determinadas as atividades fermentativas, a produção de gás e a produção de H₂S (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

b) Prova de hidrólise de gelatina

A capacidade de hidrolisar gelatina através da enzima gelatinase, foi testada inoculando uma partícula da colônia em meio contendo gelatina e incubando em estufa bacteriológica a 35°C por 24 a 48 horas. Em seguida, os tubos foram levados em geladeira por 15 minutos para realização da leitura, nos tubos onde a gelatina permaneceu liquefeita mesmo após o resfriamento, foram considerados positivos (RHODEHAMEL, 2001; ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

c) Prova de produção de urease

A produção da urease foi avaliada através da inoculação em Ágar Base Uréia Christensen (Micromed®) para determinar a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, reação que resulta na alcalinização do meio. O desenvolvimento de cor vermelha no meio após incubação representa resultado positivo da prova (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

d) Prova de degradação do citrato

A capacidade do micro-organismo utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliado através da inoculação dos isolados no Agar citrato Simons (Micromed®). Após incubação por 24h a 35°C foi observado a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do citrato (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

e) Prova de degradação do malonato

A capacidade do micro-organismo utilizar o malonato como única fonte de carbono foi

avaliado através da inoculação dos isolados em caldo malonato. Após incubação por 24h a 35°C foi observado a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do malonato (ANVISA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

3.5. Controle

Para comparação e controle de todos os testes avaliados foram utilizadas as cepas padrão ATCC de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 obtidas junto ao Laboratório de Enterobactérias/ FIOCRUZ.

3.6. Perfil de Suscetibilidade dos Micro-organismos Isolados aos Fármacos de Eleição

Após identificação, os isolados bacterianos foram submetidos aos testes de suscetibilidade através da técnica de difusão em disco. O parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade ou resistência antimicrobiana foi o CLSI (2007; 2011), período em que as coletas e análises dos mexilhões foram realizadas e momento em que o CLSI passou por reformulações para a análise de *Vibrio*.

Para o gênero *Vibrio* spp. (Tabela 1) foram utilizados os seguintes discos antimicrobianos (SENSIFAR-CEFAR[®]): ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), pefloxacina (5 µg) e tetraciclina (30 µg).

Tabela 1. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados para *Vibrio* spp. segundo o CLSI (2007; 2011).

Antimicrobianos	Zonas de Inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina (10UI)	≤13	14-16	≥17
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥21
Cloranfenicol (30µg)	≤12	13-17	≥18
Nitrofurantoína (300 µg)	≤14	15-16	≥17
Pefloxacina (5 µg)	≤15	16-18	≥19
Tetraciclina (30µg)	≤14	15-18	≥19

Para a família Enterobacteriaceae (Tabela 2) foram utilizados discos de ampicilina (10µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), aztreonam (30µg), cefalotina (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg), imipinem (10µg) e tetraciclina (30µg) (CLSI, 2007; 2011).

Tabela 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados para enterobactérias segundo o CLSI (2007; 2011).

Antimicrobianos	Zonas de Inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina (10µg)	≤13	14-16	≥17
Ampicilina-sulbactam (10µg/10µg)	≤11	12-14	≥15
Aztreonam (30 µg)	≤17	18-20	≥21
Cefalotina (30 µg)	≤14	15-17	≥18
Cefoxitina (30 µg)	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona (30 µg)	≤19	20-22	≥23
Ciprofloxacina (5µg)	≤20	21-30	≥31
Cloranfenicol (30µg)	≤12	13-17	≥18
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Imipinem (10µg)	≤19	20-22	≥23
Tetraciclina (30µg)	≤11	12-14	≥15

3.6.1 Inóculo

Os isolados foram inoculados em caldo Müeller Hinton (Micromed) acrescido de 1% de NaCl, incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

3.6.2 Difusão em disco

A suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müeller Hinton acrescido de 1% de NaCl) com o auxílio da alça de Drigalski. Foram avaliadas as concentrações dos fármacos testados já presentes em discos de sensibilidade. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 18 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2007; 2011).

3.7 Ensaios de Detecção Gênica e Extração de DNA Bacteriano

Os ensaios de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram executados de acordo com os protocolos descritos na literatura para detecção do gene *rpoA*, gene alvo da subunidade RNA polimerase, o qual é encontrado em todas as cepas de *Vibrio* (TARR et al., 2007; DALMASSO et al., 2009), do gene espécie específico de *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*) (HONDA et al., 1993), dos genes de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh* e *trh*) (HONDA et al., 1993) e do gene espécie específico de *Vibrio vulnificus* (*cth*) (BRAUNS et al., 1991).

A extração de DNA foi realizada segundo metodologia descrita por Chapman et al. (2001). Os isolados de *Vibrio* spp. foram inoculados em 1,5 mL de caldo Müeller Hinton contendo 1% NaCl e incubados por 18 a 24 h a 35 °C. Posteriormente, 1,0 mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5mL, centrifugado a 12396g por 10 min e o sobrenadante foi

descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0), centrifugado a 12396 rpm por 2 min e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de TE e incubado em banho-maria a 100 °C por 10 min. Em seguida, os microtubos foram incubados a -20°C por 30 min e depois centrifugados a 12396g por 10min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20° C.

3.8. Caracterização Genotípica do Gênero *Vibrio* e Identificação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo tampão 1X (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 2,0 mM, KCl 50 mM e 0,1% Triton X-100, pH 9,0), 0,5 µM de cada primer (BIONEER®), 0,2 mM de cada dNTP (FERMENTAS®), 1 U de DreamTaq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS®) e cerca de 20 ng de DNA total.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo SYBR Green (INVITROGEN®). Posteriormente, os géis foram visualizados em transiluminador ultra-violeta e documentados pela câmera fotográfica (SONY - Modelo DSC-HX1). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS®).

Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR multiplex para amplificação do gene *rpoA* para confirmação do gênero *Vibrio* juntamente com o primer *tlh*, que é específico para a identificação de *Vibrio parahaemolyticus* e o primer *trh* que é um marcador de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela 3). Posteriormente foi realizado o PCR multiplex para a amplificação do gene *tdh* que é marcador de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela 3). Nesta reação, o gene *tlh* foi usado como controle endógeno.

Para a identificação genotípica de *Vibrio vulnificus* foi realizado PCR multiplex com os primers *rpoA*, sendo este utilizado como controle endógeno da reação e o primer *cth*, o qual é espécie-específico de *Vibrio vulnificus* (BRAUNS et al., 1991). Os primers, os genes e ciclos utilizados estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Primers e ciclos empregados nos ensaios de amplificação do gene de identificação do gênero *Vibrio* e dos genes de identificação e virulência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

Espécie	Primers	Ciclos	Genes/Referência
<i>Vibrio</i> spp.	5'AAATCAGGCTCGGGCCTT 3' 5'GCAATTTT(A/G)TC(A/G/T)AC(C/T)GG3'	1*	<i>rpoA</i> (242 pb) (DALMASSO et al., 2009)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5'- AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG3' 5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC -3'	2*	<i>tlh</i> (450 pb) (HONDA et al. 1993)
	5'- GTA AAG GTG TCT GAC TTT TTG AC-3' 5'-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3'	3*	<i>tdh</i> (269pb) (HONDA et al. 1993)
	5'- TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3' 5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3'	4*	<i>trh</i> (500pb) (HONDA et al. 1993)
	5'- CGA ATC CTT GAA CAT ACG CAG C-3' 5'- CGC CGC TCA CTG GGG CAG TGG CTG-3'	5*	<i>cth</i> (386 bp) /(BRAUNS et al., 1991).

Legenda: 1* 1 x 94°C/3 min, 35 x (94 °C/1 min, 55°/1 min,72°/1 min), 1x 72°C/5min; 2* 35 x (94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min); 3* 35 x (94°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C 1 min); 4* 35 x (94 °C/30 s 58°C/30 s, 72°C/1 min); 5* 30 x (94°C/1 min, 68°C/1 min, 72°C/1 min).

3.9 Sequenciamento do Gene *rpoA* (Subunidade Alfa da RNA Polimerase) e Análise das Sequências de DNA

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e enviados para o sequenciamento pela empresa Helixxa Bases for Life (Campinas/SP).

As seqüências foram editadas no programa Bioedit (HALL, 1999) e submetidas ao algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), possibilitando a seleção de seqüências de nucleotídicas armazenadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com identidade com as seqüências dos micro-organismos isolados. As seqüências foram importadas para o programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007), e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Higgins et al., 1994). Dendrogramas foram construídos utilizando o algoritmo Neighbor joining (NJ) utilizando modelo de análise de nucleotídeo adequado no programa MEGA excluindo-se gaps e dados perdidos para determinação da inferência das relações filogenéticas entre os isolados estudados (KUMAR et al., 2004). A robusteza de cada ramo foi determinada usando o teste não paramétrico de bootstrap com 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes na Água do Mar

A análise microbiológica da água do mar foi realizada em todas as coletas nas profundidades de 3 e 13 m através de mergulho autônomo. O estabelecimento dessas profundidades objetivou avaliar a possível interferência da coluna de água sobre a microbiota. Do total de 7 coletas realizadas, foi obtido um total de 28 amostras de água, representados por 12 amostras em Macaé, 8 amostras em Angra dos Reis e 8 amostras em Arraial do Cabo. A presença de coliformes totais e termotolerantes não foram detectadas em nenhuma das amostras de água coletadas em Macaé e Angra dos Reis. Nas coletas realizadas em Arraial do Cabo, a presença de coliformes totais e termotolerantes foram detectadas em 50% (4/8) das amostras avaliadas, sendo estas coletadas em maio de 2011. Neste local, as amostras de água foram coletadas na fazenda de maricultura e próximo ao restaurante flutuante localizado a 500 m da fazenda. Foi possível observar que os índices de coliformes totais e termotolerantes foram maiores no ponto coletado próximo ao restaurante flutuante do que na fazenda de maricultura (Tabela 4) e não foi observado diferenças no NMP nas duas profundidades avaliadas.

Tabela 4. Médias colimétricas expressas em NMP/100mL, das amostras da água do mar em Arraial do Cabo.

Colimetria	Arraial do Cabo - Coleta Maio 2011	
	NMP/100mL da água do Mar	
	Restaurante Flutuante	Fazenda de Maricultura
Coliformes totais	280	17
Coliformes termotolerantes	170	11

A presença de coliformes totais e termotolerantes detectados em Arraial do Cabo podem estar associadas à presença de um restaurante flutuante localizado próximo a fazenda de cultivo de mexilhões. Como a presença de coliformes totais e termotolerantes foram detectadas apenas no mês de maio, período onde o turismo ainda é intenso, pode-se supor que esta contaminação vem do lançamento de dejetos do restaurante na água do mar. No mês de julho, a presença de coliformes não foi detectada e este fato pode estar associado com a redução considerável no número de turistas devido à baixa temperatura. O lançamento de dejetos humanos na água do mar, além de contaminar a água pode acarretar na contaminação dos mexilhões.

Coliformes totais e coliformes termotolerantes são consideradas bactérias indicadoras de contaminação fecal do ambiente pelo Codex Alimentarius, no caso de cultivo de moluscos bivalves e da água onde são cultivados. Este órgão recomenda que seja feita análises periódicas de toda água de cultivo e carne dos moluscos para monitorar a presença dessas bactérias (WEBSTER et al., 2004; FAO, 2009).

Apesar da colimetria da água do mar não revelar a presença de coliformes em Macaé e Angra dos Reis, cepas de *Escherichia coli* foram detectadas nos moluscos avaliados através do isolamento. Na análise microbiológica dos mexilhões, a colimetria não foi realizada.

A literatura relata que *E. coli* pode se manter cultivável em moluscos, porém não na água do mar exposta a luz solar, ocasionando diferença entre contagem bacteriana da água do mar comparada à da carne de molusco. Observam-se com frequência contagens altas de

coliformes em moluscos, mesmo quando a contagem na água do mar não indica contaminação por estes micro-organismos (VIEIRA, 2004). Sendo assim, a determinação de coliformes de origem termotolerante na carne do molusco para avaliar a qualidade do produto, apresenta maiores possibilidades como padrão de normatização no cultivo, do que a análise de água (MACHADO et al., 2001).

A detecção de *E. coli* a partir dos moluscos coletados está associada ao fato dos mexilhões serem animais filtradores e possuem a capacidade de reter bactérias em seu interior (LEAL; FRANCO, 2008). Associado a isto, a presença de *E. coli* neste ambiente pode ter sido veiculada por aves migratórias que excretam suas fezes na água do mar e pela liberação da água de lastro das embarcações que circulam por estas regiões. A proximidade da área de cultivo com a região costeira também é um fator que pode estar associado à detecção de *Escherichia coli*.

Sabe-se que o mexilhão *Perna perna* é a espécie de molusco bivalve predominante nas fazendas marinhas de todo o Brasil. O monitoramento bacteriológico de moluscos comercializados deve ser realizado frequentemente devido aos bivalves serem capazes de bioacumular patógenos presentes na coluna d'água onde crescem. A contaminação ambiental afeta tanto a sanidade do animal quando a Saúde Coletiva (LEAL; FRANCO, 2008; PEREIRA et al., 2009).

Furlan (2004) detectou coliformes totais e termotolerantes ao avaliar a água de cultivo de mexilhões no litoral de São Paulo. Da mesma forma Galvão et al. (2004) detectaram coliformes totais e termotolerantes na água de cultivo de mexilhões em Ubatuba – SP, demonstrando a importância da dinâmica populacional humana sobre este parâmetro.

Os efeitos da contaminação bacteriológica sobre os moluscos ainda são pouco conhecidos e difundidos, além de serem específicos para cada espécie de molusco e região de produção. Logo, precisam ser analisados dentro da realidade local de cada ponto de cultivo (LEE; MORGAN, 2003; PEREIRA et al., 2009).

4.2 Pesquisa de Enterobactérias e Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana

A partir das sete coletas realizadas foi possível obter um total de 88 colônias de enterobactérias, sendo representadas por 29,5% (26/88) de *Escherichia coli*, 10,2% (9/88) de *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*, 9,1% (8/88) de *Citrobacter diversus*, 7,9% (7/88) de *Enterobacter aerogenes*, 5,7% (5/88) de *Proteus vulgaris*, 4,5% (4/88) de *Serratia rubidae*, *Enterobacter sakazakii* e *Citrobacter freundii*, 3,4% (3/88) de *Hafnia alvei*, 2,3% (2/88) de *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* e *Yersinia enterocolitica* e 1,1% (1/88) de *Proteus mirabilis*. O gênero *Salmonella* não foi detectado em nenhuma das coletas realizadas. A Tabela 5 relata o perfil de distribuição das espécies de enterobactérias isoladas nos três pontos de coleta.

Moluscos bivalves são animais que se alimentam por filtração, motivo pelo qual bioacumulam patógenos em níveis muito mais elevados do que aqueles presentes nas águas em que são criados (LEAL; FRANCO, 2008). Sendo assim, a contaminação bacteriológica de seus tecidos está intrinsecamente relacionada com as condições do ambiente no qual o animal se desenvolveu durante o seu ciclo vital (LEE; MORGAN, 2003; PEREIRA, 2008). Segundo Pruzzo et al. (2005) os mexilhões são os maiores acumuladores de poluentes do meio ambiente, destacando-se como bioindicadores da insalubridade da água. A contaminação de águas dos rios, lagos e mares por esgotos urbanos não tratados e dejetos industriais, além de produtos químicos, são responsáveis pela degradação dos recursos hídricos do Brasil e da maioria dos países do mundo.

A coleta de moluscos, na maioria das vezes nessa região, ocorre de forma extrativista, estendendo-se, geralmente, durante todo o ano. Não há regulamentação legal ou mesmo

instrução normativa por parte dos órgãos ambientais estaduais e municipais para sua captura. Existem, no entanto, resoluções e portarias nacionais que regulamentam e estabelecem padrões de qualidade indispensáveis, para que a água e os bivalves possam ser utilizados pelo homem com segurança, sem agravos à saúde (LEAL et al., 2008).

Tabela 5. Número de espécies de enterobactérias isoladas nos três pontos de coleta.

Micro-organismos Isolados	Número de Micro-organismos Isolados		
	Macaé (n=20)	Angra dos Reis (n=23)	Arraial do Cabo (n=45)
<i>Citrobacter diversus</i>	01	04	03
<i>Citrobacter freundii</i>	01	03	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01	05	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	02	06
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-*	01	08
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	01	03
<i>Escherichia coli</i>	06	05	15
<i>Hafnia alvei</i>	02	-	01
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	02
<i>Morganella morganii</i>	-	01	01
<i>Proteus vulgaris</i>	04	-	01
<i>Proteus mirabilis</i>	-	01	-
<i>Serratia marcescens</i>	02	-	-
<i>Serratia rubidae</i>	-	-	04
<i>Yersinia enterocolitica</i>	02	-	-

*: Não detectado.

Por meio da contagem padrão em placa a partir da análise de moluscos e da água utilizada para cultivo, na Bahia, Brasil, Sande et al. (2010) isolaram um total de 68 micro-organismos, identificados como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia rettgeri*, *Providencia sp.*, *Salmonella typhi*, *Serratia rubidaea* e *Shigella sp.*

Outros estudos também apontam para o isolamento de enterobactérias a partir de mexilhões. De acordo com Galvão et al. (2004) e Santos (2010) diversos gêneros bacterianos tem sido isolados dos mexilhões, como *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* e *Escherichia*.

Bactérias como *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp.* foram detectadas em bivalves cultivados na Nigéria (FERNANDEZ-DELGADO et al., 2007) e cepas *Escherichia coli* foram isoladas a partir de bivalves cultivadas no rio Pacoti, Ceará (VIEIRA et al., 2008).

No trabalho desenvolvido por Henriques (2001) foram identificadas colônias de *Shigella sp.*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* a partir de mexilhões proveniente de bancos naturais da Baixada Santista. Os resultados apontaram uma maior infestação no tecido mole dos animais do que na água do mar, demonstrando que os mexilhões são eficientes bioindicadores bacteriológicos.

A não detecção de *Salmonella* corrobora com trabalho desenvolvido por Henriques et al. (2006) que ao avaliarem 50 mexilhões coletados da Ilha de Urubuqueçaba, estado de São Paulo, não detectaram a presença de *Salmonella* em nenhum dos mexilhões coletados. De igual modo Cordeiro et al. (2007) não detectaram a presença de *Salmonella* ao avaliarem mexilhões cultivados e comercializados no município de Ubatuba, São Paulo.

A detecção de bactérias com potencial patogênico alerta para o risco do consumo *in natura* desses moluscos e para a necessidade de um monitoramento do ambiente de cultivo.

Em relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, a partir dos 88 isolados de enterobactérias foram detectados 64,7% (57/88) de resistência à ampicilina, 39,7% (35/88) à cefalotina, 30,7% (27/88) à gentamicina, 26,1% (23/88) à ceftioxina, 15,9% (14/88) à ceftriaxona e tetraciclina, 13,6% (12/88) ao cloranfenicol, 11,4% (10/88) à ciprofloxacina, 7,9% (7/88) à ampicilina-sulbactam e aztreonam e 1,1% (1/88) ao imipenem. Os percentuais de resistência antimicrobiana relativo aos diferentes pontos de coleta estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Percentual de Resistência Antimicrobiana de Enterobactérias nos Diferentes Pontos de Coleta.

Antibióticos	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)		
	Macaé (n=20)	Angra dos Reis (n=23)	Arraial do Cabo (n=45)
Ampicilina	100	47,8	57,8
Ampicilina-sulbactam	-*	8,7	11,1
Aztreonam	-	-	15,5
Cefalotina	-	52,1	51,1
Ceftioxina	10	39,1	26,7
Ceftriaxona	-	8,7	26,7
Ciprofloxacina	-	13	15,5
Cloranfenicol	-	8,6	22,2
Gentamicina	-	30,4	44,4
Imipenem	5	-	-
Tetraciclina	-	13	24,4

Legenda: -*: Resistência não detectada.

No estudo realizado por Dias et al. (2010) a partir de 44 cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões capturados em áreas de extrativismo no município de Niterói, foi observado que 50% (22/44) das cepas apresentaram resistência a penicilina, 40,90% (18/44) a oxilina e 2,27% (1/44) a ampicilina. A resistência à norfloxacina e ciprofloxacina não foi detectada. Vieira et al. (2008) ao avaliarem o perfil de resistência antimicrobiana de 25 isolados de *Escherichia coli* provenientes do líquido intravalvar de bivalves detectaram 68% de resistência a ampicilina, 60% a tetraciclina, 24% ao sulfametoxazol-trimetoprim, 16% a nitrofurantoína e 8% a ciprofloxacina.

O elevado percentual de resistência a penicilina está associado ao fato de *Escherichia coli*, assim como outras enterobactérias serem produtoras de β -lactamases, enzimas que rompem os anéis β -lactâmicos, inativando as penicilinas (DIAS et al., 2010).

A resistência antimicrobiana detectada nos isolados bacterianos no presente trabalho pode estar associada ao lançamento de esgoto diretamente no ambiente aquático (SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003) bem como, estes micro-organismos resistentes podem ter sido carregados através das fezes de aves migratórias e embarcações localizadas próximos aos pontos de coleta.

A literatura aponta para um aumento considerável no índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, entretanto ações simples de higiene e manejo sanitário adequados são cada vez mais relatadas como formas simples e eficazes para prevenção de doenças e possível contribuição para a redução da resistência bacteriana (VIERA et al., 2008; DIAS et al., 2010). O monitoramento da questão da resistência antimicrobiana e de sua evolução, com

estabelecimento de programas de vigilância dessa resistência em indicadores bacterianos da microbiota dos animais torna-se importante, uma vez que os moluscos concentram em seu interior micro-organismos com potencial patogênico e resistentes aos antimicrobianos.

Ao avaliar o perfil de resistência das espécies bacterianas isoladas dos mexilhões em cada ponto de coleta foi possível observar que em Macaé, todas as espécies detectadas (n=20) foram resistentes a ampicilina e que a resistência detectada de 10% a cefoxitina (2/20) e 5% (1/20) ao imipenem foi em isolados de *Escherichia coli*.

Em Angra dos Reis e Arraial do Cabo a distribuição da resistência antimicrobiana de acordo com a espécie bacteriana isolada estão representadas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de Enterobactérias Isoladas de Mexilhões coletados em Angra dos Reis.

Número de Espécies de Enterobactérias (n=23)	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)								
	Amp	Amp+ Sulb	Cfl	Cfo	Ctx	Cip	Clo	Gen	Tet
<i>Citrobacter diversus</i> (n=4)	-*	-	50	50	-	25	-	75	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=3)	66,7	-	100	66,7	-	-	33,4	-	33,4
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=5)	80	40	60	40	-	20	-	40	20
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	100	-	50	50	50	50	-	50	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> (n=1)	-	-	100	100	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i> (n=1)	-	-	100	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=5)	40	-	-	20	-	-	20	20	-
<i>Morganella morganii</i> (n=1)	100	-	100	-	100	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Legenda: *: Não detectado. Amp: ampicilina; Amp-sulb: ampicilina-sulbactam; Cfl: cefalotina; Cfo: cefoxitina; Ctx: ceftriaxona; Cip: ciprofloxacino; Clo: cloranfenicol; Gen: gentamicina; Tet: tetraciclina.

Tabela 8. Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de Enterobactérias Isoladas de Mexilhões coletados em Arraial do Cabo.

Número de Espécies de Enterobactérias (n=45)	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)									
	Amp	Amp-Sulb	Cfl	Cfo	Ctx	Cip	Clo	Gen	Tet	Atm
<i>Citrobacter diversus</i> (n=3)	100	33,4	33,4	33,4	33,4	-	33,4	-	33,4	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)	100	-	100	-	100	100	-	100	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=6)	83,4	16,7	50	33,4	50	-	16,7	33,4	16,7	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> (n=8)	75	12,5	62,5	37,5	37,5	-	37,5	37,5	50	37,5
<i>Enterobacter sakazakii</i> (n=3)	66,7	-	66,7	-	-	-	-	66,7	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=15)	33,3	6,7	40	13,4	20	20	20	53,4	13,4	20
<i>Hafnia alvei</i> (n=1)	-	-	100	100	-	100	-	100	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=2)	50	50	50	100	50	-	50	50	50	-
<i>Morganella morganii</i> (n=1)	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=1)	100	-	100	100	-	100	100	100	100	-
<i>Serratia rubidae</i> (n=4)	25	-	25	-	-	25	-	25	25	25

Legenda: *: Não detectado. Amp: ampicilina; Amp-sulb: ampicilina-sulbactam; Cfl: cefalotina; Cfo: cefoxitina; Ctx: ceftriaxona; Cip: ciprofloxacino; Clo: cloranfenicol; Gen: gentamicina; Tet: tetraciclina; Atm: aztreonam.

A ampicilina foi o antimicrobiano que apresentou o maior percentual de resistência, fato este associado ao uso indiscriminado deste antimicrobiano na medicina humana e veterinária. Ao comparar os dados de resistência da ampicilina com à ampicilina-sulbactam nos isolados bacterianos provenientes de mexilhões coletados em Angra dos Reis, foi possível observar que a resistência a este fármaco foi detectada apenas em 40% de (2/5) *Enterobacter aerogenes*. Em relação ao total de enterobactérias isoladas em Angra dos Reis a resistência a ampicilina-sulbactam foi de 8,7% (2/23).

Em Arraial do Cabo, a resistência a ampicilina-sulbactam foi detectada em 33,4% (1/3) dos isolados de *Citrobacter diversus*, 16,7% (1/6) de *Enterobacter cloacae*, 12,5% (1/8) de *Enterobacter agglomerans*, 6,7% (1/15) de *E. coli* e 50% (1/2) de *Klebsiella oxytoca*. Em relação ao total de enterobactérias isoladas em Arraial do Cabo a resistência a ampicilina-sulbactam foi de 11,1% (5/45). O sulbactam é um inibidor de beta-lactamase que possui fraca atividade antibacteriana, no entanto protege o antimicrobiano contra a degradação por enzimas beta-lactamases e estende de forma efetiva seu espectro de ação antimicrobiana. É comumente utilizado em cepas resistentes à ampicilina e amoxicilina e é uma alternativa terapêutica no tratamento de infecções por micro-organismos produtores de beta-lactamase e multirresistentes.

Em relação às cefalosporina, sabe-se que estas são classificadas em gerações, sendo a cefalotina, cefoxitina e ceftriaxona de primeira, segunda e terceira geração, respectivamente. As cefalosporinas de terceira geração são as mais efetivas frente às enterobactérias. Este fato é observado no presente trabalho, onde a ceftriaxona demonstrou melhor ação antimicrobiana.

A resistência detectada ao cloranfenicol é um achado que levanta questionamentos sobre o uso deste medicamento, uma vez que seu uso foi proibido na medicina veterinária. No entanto, sabe-se que este antimicrobiano é usado na medicina humana. O cloranfenicol foi amplamente utilizado no tratamento da salmonelose em animais, e sua proibição ocorreu em 1994. Acredita-se que a resistência detectada a este fármaco esteja associado com a introdução do florfenicol, medicamento usado na medicina veterinária, ocasionando uma resistência cruzada entre cloranfenicol e florfenicol em isolados bacterianos (ARCANGIOLI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2010).

A baixa resistência detectada ao aztreonam em Arraial do Cabo reflete o fato deste fármaco ser ainda de uso restrito no ambiente hospitalar. No entanto, acredita-se que a detecção de cepas resistentes no ambiente decorra do lançamento do esgoto hospitalar direto nos rios, ocasionando contaminação ambiental (FUENTEFRÍA et al., 2008). A resistência a este fármaco não foi detectada nos isolados bacterianos de Angra dos Reis e Macaé.

A resistência à tetraciclina foi detectada em isolados bacterianos proveniente de mexilhões coletados em Angra dos Reis (3/23) e Arraial do Cabo (10/45). Rhama et al. (2008) ao avaliarem a resistência à tetraciclina em bactérias presentes na água do Oceano Atlântico e Pacífico, relataram a resistência a este fármaco. Segundo estes autores, é provável, que o ambiente marinho seja um recetor de esgoto doméstico, podendo contribuir para a resistência antimicrobiana.

Associado a isso, o emprego de antibióticos no tratamento de patologias bacterianas na aqüicultura sem controle do descarte da água de cultivo, mostra-se limitado devido a sua relativa eficácia e possível desenvolvimento de cepas resistentes, alterando a microbiota das áreas afetadas. Os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate de doenças humanas e de animais aquáticos cultivados. Entretanto, o seu uso indiscriminado pode provocar transferência da resistência do fármaco a patógenos humanos, modificação na microbiota de consumidores devido aos antibióticos presentes no alimento e toxicidade de alguns deles aos manuseadores de animais (COSTA et al., 2008b).

Segundo Cabello (2006) a grande utilização de antimicrobianos na profilaxia de infecções em aquicultura está aumentando a possibilidade da contaminação do meio ambiente, dos animais e do próprio homem com bactérias resistentes. A presença de bactérias resistentes no ambiente aquático, em particular no sedimento pode refletir em alterações significativas sobre a população de outros organismos aquáticos alterando o equilíbrio ecológico (HERNANDEZ et al. 2005). Logo, alternativas buscando a antibioticoterapia planejada, a adoção de medidas de manejo sanitário e o uso de probióticos são muito importantes para reduzir os riscos aos seres humanos e ao meio ambiente sem prejudicar, financeiramente a produção em aquicultura (CABELLO et al. 2006; COSTA et al., 2008a).

Os antimicrobianos adicionados à água podem levar à formação de resíduos que contaminam água, solo e consumidores. Relata-se a presença e persistência destes compostos nos peixes e outros organismos utilizados para consumo humano (CARNEIRO et al., 2007; COSTA et al., 2008a) e nos sedimentos ambientais (KÜMMERER, 2004). Outra fonte de antimicrobianos nos tanques de peixes nestas fazendas é a utilização de dejetos de animais para adubação do plâncton que serve de alimento para peixes filtradores, como a tilápia. Assim, os excrementos de animais podem veicular resíduos de antimicrobianos ou bactérias resistentes aos antimicrobianos para o ambiente aquícola, que por sua vez podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio do pescado contaminado e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota indígena ou potencialmente patogênicas para seres humanos (CARNEIRO et al., 2007; ARIAS & CARRILHO, 2012).

4.3 Pesquisa de *Aeromonas*

A partir das 7 coletas realizadas foi obtido um total de 12 isolados de *Aeromonas* spp., sendo 3 isoladas em Macaé, 4 em Angra dos Reis e 5 em Arraial do Cabo. No trabalho desenvolvido por Ottaviani et al. (2006), isolados de *Aeromonas* foram detectados em amostras de mexilhões coletadas em bancos naturais no Mar Adriático na Itália. Das 144 amostras avaliadas, 32 cepas de *Aeromonas* foram isoladas, sendo 12 virulentas e patogênicas em ratos.

Aeromonas spp. são micro-organismos de ocorrência amplamente difundida no ambiente aquático nomeadamente água doce, água potável, águas contaminadas, água do mar, sistemas de distribuição de água para consumo, águas termais, lagos, rios e mar (PALÚ et al., 2006; SEPE et al., 2008). A incidência de *Aeromonas* spp. na água utilizada para consumo tem sido alvo de interesse, dada a sua importância em termos de saúde pública. *Aeromonas* spp. pode causar infecções entéricas ou extraintestinais após o consumo de água ou alimentos contaminados (PEREIRA et al., 2004; HERNOULD, 2008).

A presença de *Aeromonas* na água do mar é relevante, visto que este micro-organismo não é encontrado com grande frequência em locais de alta salinidade, como nos pontos de coletas avaliados, e sua importância deve ser reconhecida devido à elevada capacidade de virulência (PEREIRA et al., 2008). Existe a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre este micro-organismo, a fim de elucidar sua real importância para os campos da microbiologia e vigilância sanitária (VILLARI et al., 2003).

4.4. Identificação de *Vibrio* spp.

4.4.1 Identificação fenotípica das espécies de *Vibrio*.

Ao total, foram realizadas sete coletas de mexilhões *Perna perna*, sendo três coletas em Macaé, no período de junho de 2007 a maio de 2008, duas coletas em Angra dos Reis, em outubro de 2010 e fevereiro de 2011, e duas coletas em Arraial do Cabo, em maio e julho de 2011. Foi obtido um total de 209 isolados de *Vibrio* spp., sendo representados por *Vibrio*

parahaemolyticus 40,66% (85/209), *Vibrio alginolyticus* 19,6% (41/209), *Vibrio vulnificus* 12,4% (26/209) e 27,2% (57/209) de outras espécies de *Vibrio* spp. A Tabela 9 relata o perfil de distribuição das espécies de *Vibrio* isoladas nos três pontos de coleta.

Tabela 9. Perfil de distribuição das espécies de *Vibrio* isoladas nos diferentes pontos de coleta.

Espécies	Número de Isolados por Ponto de Coleta		
	Macaé (n=100)	Arraial do Cabo (n=58)	Angra dos Reis (n=51)
<i>Vibrio aestuarinus</i>	-	1	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	15	11	15
<i>Vibrio anguillarum</i>	2	-	-
<i>Vibrio carchariae</i>	1	1	1
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	-	1	-
<i>Vibrio costicola</i>	-	1	1
<i>Vibrio damsela</i>	2	-*	1
<i>Vibrio fisheri</i>	-	1	1
<i>Vibrio harveyi</i>	8	2	3
<i>Vibrio metschnikovii</i>	-	1	-
<i>Vibrio mimicus</i>	1	2	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	44	18	23
<i>Vibrio vulnificus</i>	20	3	3
<i>Vibrio</i> spp.	7	16	3

Legenda:*-: Não detectado.

Vibrio spp. é um micro-organismo natural de ambientes aquáticos, especialmente ambientes marinhos. O gênero é representado por bactérias patogênicas aos seres humanos como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* e bactérias patogênicas aos animais como *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio carchariae* (PANICKER & BEJ, 2005; XIE et al., 2005; NORDSTROM et al., 2007; VIEIRA et al., 2010).

Entre as espécies detectadas, destaca-se *Vibrio parahaemolyticus* com 40,6% (85/209) dos isolados, uma vez que este micro-organismo é encontrado em todo o ambiente marinho e representa um problema de saúde pública, pois é responsável por quadros de gastroenterite após a ingestão de frutos do mar crus ou parcialmente cozidos (ALTEKRUSE et al., 2000; NORDSTROM et al., 2007). A patogenicidade deste micro-organismo em humanos está associada à produção de uma hemolisina termoestável direta, codificada pelo gene *tdh*, e hemolisina termoestável relacionada, codificada pelo gene *trh* (ROJAS et al., 2011).

Vibrio vulnificus 12,4% (26/209) pode causar gastroenterite e septicemia fatal através do consumo de frutos do mar mal cozidos ou crus. A presença deste microorganismo pode apresentar um problema às atividades pesqueiras, pois durante estas práticas, cortes e microfissuras podem acontecer. Neste caso, uma ferida aberta exposta a água do mar pode conduzir a um quadro de septicemia ou até mesmo amputação da parte do corpo afetada (PATEL et al., 2002; PANICKER & BEJ, 2005).

O isolamento de *Vibrio alginolyticus* 19,6% (41/209) é relevante no aspecto epidemiológico, pois representa patógeno ubiqüitário do ambiente aquático, sendo também considerado parte da microbiota saprófita de animais marinhos. Pode causar patologia humana e em animais associada à infecção tendo como principal via de acesso os cortes ou lesões cutâneas expostos ao ambiente marinho. Este aspecto torna o patógeno de grande

interesse, particularmente para profissionais em atividades que envolvem aqüicultura e também manipulação de alimentos e beneficiamento de pescado (XIE et al., 2005; PEREIRA et al., 2007a).

Vibrio harveyi 13,4% (13/209) tem sido reconhecido como patógeno de vários organismos marinhos em todo o mundo (AUSTIN & ZHANG, 2006; FUKUI & SAWABE, 2008). Espécies como *V. metschnikovii* 0,47% (1/209), *Vibrio cincinnatiensis* 0,47% (1/209), *Vibrio fisherii* 0,95% (2/209), *Vibrio costicola* 0,95% (2/209), *Vibrio mimicus* 1,43% (3/209), e *Vibrio damsela* 1,43% (3/209) foram isoladas em baixo percentual, no entanto, ressalta-se sua importância, visto que há relatos de isolamento de algumas destas espécies em humanos (PEREIRA et al., 2007a). A detecção destes microorganismos reflete as condições microbiológicas do habitat dos mexilhões avaliados. No momento da coleta, foi detectado um baixo percentual dessas espécies, o que poderia ser modificado diante de alterações nas condições ambientais que favorecessem a multiplicação desses agentes de reconhecida importância devido à sua capacidade de virulência (PRUZO et al., 2005; PEREIRA et al., 2007a). *Vibrio anguillarum* 0,95% (2/209), *Vibrio aestuarinus* 0,47% (1/209) e *Vibrio carchariae* 1,43% (3/209) assumem papel de destaque, pois são importantes patógenos isolados de animais aquáticos e apresentam relevância na aqüicultura (YEUNG et al., 2004; PEREIRA et al., 2007a).

Vieira et al. (2010) relatam *Vibrio carchariae* em coleções de ostras e associados a úlcera crônica em tubarão, na Itália. Este micro-organismo pertence à microbiota normal da pele de tubarões, mas pode tornar-se patológico quando o animal está sob stress. Além disso, tem sido descrito como agente etiológico de alguns peixes sob cultivo (LEE et al., 2002).

Pereira et al. (2007) ao avaliarem a qualidade microbiológica de mexilhões *in natura*, provenientes da Estação Experimental de Cultivo, no Rio de Janeiro, detectaram 136 isolados de *Vibrio*, sendo as espécies com menor prevalência representadas por *Vibrio aestuarinus* 0,73 (1/136), *Vibrio harveyi* 0,73 (1/136), *Vibrio anguillarum* 3% (4/136), *Vibrio damsela* 4,4% (6/136), *Vibrio cincinnatiensis* 3,6% (5/136) e *Vibrio carchariae* 6% (8/136). No entanto, apesar destes micro-organismos não serem isolados com frequência, sua detecção requer cuidado, pois podem ocasionar doenças em humanos e animais.

Foi detectada ainda a presença de *Vibrio* spp. em 12,4% (26/209) dos isolados. Este grupo agrega diferentes espécies que por serem oriundas de amostras ambientais, não apresentaram perfil fenotípico definido, possivelmente por variações decorrentes de adaptações ao ambiente circundante. Estudos genotípicos adicionais serão realizados no objetivo de aprimorar essa identificação.

Diversos estudos têm avaliado as condições microbiológicas de mariscos. Colakoglu et al. (2006) avaliaram 127 amostras de mariscos, sendo prevalente os gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*. Das 127 amostras, foi possível observar crescimento microbiano em 84, representado pelos seguintes microorganismos: 26,7% de *Vibrio alginolyticus*, 9,4% de *Vibrio vulnificus*, 0,8% de *Vibrio parahaemolyticus* e 29,1% de *Aeromonas hydrophila*.

4.4.2 Perfil de suscetibilidade de *Vibrio* spp. isolados de mexilhões *Perna perna*

A partir dos 209 isolados de *Vibrio* spp. foi detectado 91,3% (191/209) de resistência à ampicilina, 23,9% (50/209) à ciprofloxacina, 18,6% (39/209) à nitrofurantoína, 5,7% (12/209) à tetraciclina, 4,3% (9/209) à pefloxacina e 3,3% (7/209) ao cloranfenicol.

Os percentuais de resistência antimicrobiana relativo aos diferentes pontos de coleta estão expostos na Tabela 10.

Foi possível observar diferenças de percentuais de resistência entre os diferentes pontos de coleta e pode ser justificada por vários motivos: Em Macaé, o local de coleta encontra-se afastado da costa. A resistência de 100% (100/100) à ampicilina merece atenção,

podendo estar associada a vários fatores ambientais como liberação da água de lastro de pequenas embarcações e rebocadores no Arquipélago de Santana, proximidade do rio Macaé que pode atuar como carreador de substâncias oriundas de dejetos domésticos e hospitalares, presença de correntes marítimas e pelo fato dos costões rochosos serem berçários de aves que por sua vez liberam seus dejetos no ambiente. A ampicilina é um antimicrobiano beta-lactâmico semi-sintético obtido a partir do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), de uso amplamente disseminado na terapêutica médica, com inúmeros relatos de resistência por parte de diferentes espécies bacterianas (ROLINSON et al., 2007). Trata-se de um antibiótico beta-lactâmico usado no tratamento de diversas doenças infecciosas. A hidrólise do anel beta-lactâmico deste antimicrobiano, pela enzima beta-lactamase, é o mecanismo de resistência mais comum em bactérias Gram-negativas e tem um papel crítico na seleção da terapia apropriada (BUSH; JACOB, 2010).

Tabela 10. Percentual de resistência antimicrobiana de *Vibrio* spp. nos diferentes pontos de coleta.

Antibióticos	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)		
	Macaé (n=100)	Angra dos Reis (n=51)	Arraial do Cabo (n=58)
Ampicilina	100	84,3	82,7
Ciprofloxacina	-	37,2	53,4
Nitrofurantoína	-	31,3	39,6
Tetraciclina	-	-	20,6
Pefloxacina	-	-	15,5
Cloranfenicol	-	-	12

Legenda: -*: Não detectado.

No ponto de coleta localizado em Angra dos Reis, a partir de 51 isolados de *Vibrio* spp., foi detectado 84,3% (43/51) de resistência à ampicilina, 37,2% (19/51) à ciprofloxacina e 31,3% (16/51) à nitrofurantoína. Esta resistência pode estar associada com a proximidade da fazenda de maricultura com a região costeira e devido à presença de casas lançando esgoto no mar, próximo a fazenda de cultivo. A Tabela 11 relata a distribuição das espécies de *Vibrio* provenientes de mexilhões coletados em Angra dos Reis resistentes aos antibióticos testados.

Tabela 11. Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de *Vibrio* Isoladas de Mexilhões coletados em Angra dos Reis.

Espécies de <i>Vibrio</i>	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)		
	Ampicilina	Ciprofloxacina	Nitrofurantoína
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (n=23)	73,9	39,1	39,1
<i>Vibrio alginolyticus</i> (n=15)	86,7	33,4	20
<i>Vibrio harveyi</i> (n=3)	100	66,7	33,4
<i>Vibrio vulnificus</i> (n=3)	100	33,3	-
<i>Vibrio</i> spp. (n=3)	100	33,4	66,7
<i>Vibrio costicola</i> (n=1)	100	100	-
<i>Vibrio damsela</i> (n=1)	100	-*	100
<i>Vibrio carchariae</i> (n=1)	100	-	-
<i>Vibrio fisherii</i> (n=1)	100	-	-

Legenda: *: Não detectado.

Em Arraial do Cabo foi detectado maior diversidade de resistência frente aos antibióticos testados. A partir de 58 isolados de *Vibrio* spp. foi detectado 82,7% (48/58) de

resistência à ampicilina, 53,4% (31/58) à ciprofloxacina, 39,6% (23/58) à nitrofurantoína, 20,6% (12/58) à tetraciclina, 15,5% (9/58) à pefloxacina e 12% (7/58) ao cloranfenicol. A Tabela 12 relata a distribuição das espécies de *Vibrio* provenientes de mexilhões coletados em Arraial do Cabo.

Tabela 12. Percentual de Resistência Antimicrobiana das Espécies de *Vibrio* Isoladas de Mexilhões coletados em Arraial do Cabo.

Espécies de <i>Vibrio</i>	Percentual de Resistência Antimicrobiana (%)					
	Amp	Cip	Nit	Tet	Pef	Clo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (n=18)	94,4	83,4	44,5	27,8	16,7	16,7
<i>Vibrio alginolyticus</i> (n=11)	81,8	63,6	54,5	18,2	27,3	9,1
<i>Vibrio harveyi</i> (n=2)	100	50	-*	50	50	-
<i>Vibrio vulnificus</i> (n=3)	33,4	-	66,7	-	-	-
<i>Vibrio</i> spp. (n=16)	43,7	12,5	12,5	6,2	-	-
<i>Vibrio costicola</i> (n=1)	100	100	100	-	-	-
<i>Vibrio mimicus</i> (n=2)	100	-	-	-	-	-
<i>Vibrio carchariae</i> (n=1)	100	100	100	-	100	-
<i>Vibrio fisherii</i> (n=1)	100	100	-	-	-	-
<i>Vibrio aestuarinus</i> (n=1)	-	100	-	-	-	-
<i>Vibrio cincinnatiensis</i> (n=1)	100	100	-	-	-	-
<i>Vibrio metschnikovii</i> (n=1)	100	100	-	-	100	-

Legenda: *: Não detectado. Amp: ampicilina; Cip: ciprofloxacina; Nit: Nitrofurantoína; Tet: tetraciclina; Pef: pefloxacina; Clo: cloranfenicol.

A proximidade da fazenda de maricultura à região costeira e a presença de restaurante flutuante a mínima distância da fazenda podem contribuir para os índices e a diversidade da resistência detectada. Pois os micro-organismos podem ser carreados para o local de cultivo de mexilhões e estes podem trocar informação genética com a microbiota ambiental.

Rojas et al. (2011) relataram que em 19 isolados ambientais de *Vibrio* foi detectada baixa suscetibilidade as penicilinas, sendo que 6 apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos, representados pela ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina.

No trabalho desenvolvido por Costa et al. (2008) foi detectado resistência antimicrobiana em diferentes espécies de *Vibrio*. As espécies que apresentaram resistência foram: *V. cholerae*, onde 33,33% (4/12) apresentaram resistência a sulfametoxazol-trimetoprim e a ceftriaxona, e 25% (3/12) com resistência a ampicilina. Das cepas de *V. fluvialis*, 16,7% (1/6) apresentaram resistência a sulfametoxazol-trimetoprim e 33,33% (2/6) a ampicilina. Das cepas de *Vibrio* spp, 16,7% (1/6) revelaram resistência a sulfametoxazol-trimetoprim e 16,7% (1/6) a ceftriaxona. Das estirpes de *V. harveyi*, 20% (1/5) apresentaram resistência a sulfametoxazol-trimetoprim. A resistência a ampicilina foi observada em *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* e *V. costicola*.

Zanetti et al. (2001) relataram que isolados clínicos e ambientais de *V. parahaemolyticus* demonstraram resistência ao cloranfenicol, tetraciclina e cefotaxima.

A presença de cepas de *Vibrio* resistentes a antibióticos na aquicultura foi relatada. Moriarty et al. (1999), nas Filipinas em 1996 estudou amostras de *Vibrio* isoladas de camarão e verificou que todos os isolados apresentaram resistência aos antibióticos, incluindo cloranfenicol, furazolidonas, oxitetraciclinas e estreptomicinas.

A detecção de cepas resistentes ao cloranfenicol é um dado preocupante. Entre as décadas de 50 a 90 o cloranfenicol foi utilizado como fármaco de escolha para o tratamento da salmonelose em animais, mas em 1994, este antimicrobiano foi proibido na Europa para o uso em animais de produção. No entanto, em 1995, foi introduzido no mercado veterinário o

florfenicol, da mesma família do cloranfenicol, para uso em animais domésticos e desde então tem sido observado a resistência cruzada para cloranfenicol e florfenicol em isolados bacterianos (ARCANGIOLI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2010).

Apesar da utilização da nitrofurantoína ter sido proibida na produção animal, tem se observado resistência bacteriana a este antimicrobiano em isolados animais. Sabe-se que este fármaco é utilizado na medicina humana para o tratamento de infecções do trato genitourinário e esta prática pode levar a uma pressão na seleção de cepas resistentes em isolados de animais (SOUZA et al., 2010).

No presente trabalho, foi possível observar diferentes perfis de resistência nos diferentes pontos de coleta. Em Macaé foi detectado apenas um perfil de resistência, sendo todos os isolados resistentes a ampicilina e sensíveis aos demais antimicrobianos testados. No entanto, em Angra dos Reis e Arraial do Cabo foi possível detectar 4 (Tabela 13) e 16 perfis (Tabela 14) de resistência, respectivamente.

Tabela 13. Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados de *Vibrio* spp. provenientes de mexilhões coletados em Angra dos Reis.

Número De Isolados Por Perfil	Perfis de Resistência
1 (14)	Amp, Cip
2 (13)	Amp
3 (11)	Amp, Nit
4 (5)	Amp, Cip, Nit

Legenda: Amp: ampicilina; cip: ciprofloxacino; nit: nitrofurantoína.

Tabela 14. Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados de *Vibrio* spp. provenientes de mexilhões coletados em Arraial do Cabo.

Número de Isolados por Perfil	Perfis de Resistência
1 (14)	Amp, Cip
2 (11)	Amp
3 (4)	Amp, Cip, Nit
4 (4)	Amp, Clo, Nit, Tet
5 (4)	Amp, Cip, Pef, Nit, Tet
6 (3)	Nit
7 (3)	Amp, Cip, Pef
8 (2)	Amp, Nit
9 (2)	Amp, Cip, Pef Tet
10 (1)	Amp, Cip, Clo, Nit, Tet
11 (1)	Amp, Nit, Tet
12 (1)	Amp, Cip, Nit
13 (1)	Cip, Nit
15 (1)	Amp, Cip, Clo, Nit
16 (1)	Clo, Nit

Legenda: Amp: ampicilina; cip: ciprofloxacino; pef: pefloxacino; clo: cloranfenicol; nit: nitrofurantoína; tet: tetraciclina.

A resistência a antibióticos em micro-organismos pode ser produzida por características inerentes às células, sendo geralmente determinada por genes cromossômicos.

Por outro lado, algumas cepas podem sofrer mutações, receber plasmídeos ou transposons e, desse modo, adquirir uma resistência que anteriormente não existia (COSTA et al., 2008).

A diversidade genética em ambiente aquático é caracterizada pela presença de dois sistemas genéticos diferentes, compostos de DNA cromossomal e extra-cromossomal e os micro-organismos 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 (NWOSU, 2001). 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, contribuindo para o aumento do número de múltipla resistência bacteriana, aumentando assim o risco de transferência de plasmídios e codificação de resistência para micro-organismos patógenos (MIRANDA; ZEMELMAN, 2002).

Segundo Pereira (2003) a resistência antimicrobiana detectada no ambiente marinho 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.

Akinbowale et al. (2006) realizaram um levantamento sobre a ocorrência de resistência em isolados bacterianos de diversas espécies aquáticas cultivadas e do ambiente a qual estes estavam inseridos e detectaram cepas resistentes à ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina e sensibilidade ao florfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim. O uso contínuo de um determinado antimicrobiano leva ao surgimento de cepas resistentes em espécies cultivadas e eleva o percentual de resistência em cepas ambientais (TENDENCIA; PEÑA, 2002).

Diversos estudos abordam a questão da resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de tanques de cultivos de camarões como Carneiro et al. (2007) que caracterizaram o perfil de suscetibilidade de 21 cepas de *Vibrio* isoladas em 3 sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e observaram um elevado número (95,24%) de resistência a ampicilina. Manjusha et al. (2005) pesquisaram resistência a diferentes antimicrobianos em 119 isolados de *Vibrio* sp de camarões cultivados em diferentes pontos da Índia e detectaram 100% de resistência à ampicilina, 6,25% à gentamicina, 12,5% ao ácido nalidíxico e 31,25% à tetraciclina. A presença de cepas de *Vibrio* em amostras de água e de camarão resistentes a antibióticos sugere que tanto os camarões, como a área de cultivo estudada, podem constituir fonte de bactérias resistentes.

Existe uma preocupação no que diz respeito ao descarte da água de cultivo, uma vez que nestes tanques são adicionados antibióticos para prevenir doenças nos animais e esta água muitas vezes é lançada diretamente no ambiente marinho sem tratamento prévio. Desta forma, bactérias ambientais podem adquirir resistência a determinados antibióticos.

Por outro lado, a literatura reporta que outro fator deve ser levado em consideração. O fato de que os micro-organismos produtores de antibióticos no meio ambiente apresentam mecanismos de auto-proteção, os quais são codificados geneticamente. Admite-se que a transferência de genes de resistência de bactérias não patogênicas ou de baixa patogenicidade para microorganismos patogênicos é um fenômeno comum. Dessa forma, a existência de determinantes de resistência transmissíveis é anterior ao emprego dos antibióticos na terapêutica, supondo-se que o meio ambiente possa ser um reservatório de genes de resistência a antibióticos (ALLEN et al., 2010).

4.5 Identificação Genotípica do Gênero *Vibrio*

Após a identificação fenotípica, todos os isolados de *Vibrio* spp. foram submetidos a identificação genotípica, através da detecção do gene *rpoA*, o qual é encontrado em todas as cepas de *Vibrio* (TARR et al., 2007; DALMASSO et al., 2009; JEYASEKARAN et al., 2011).

Todos os 209 isolados identificados fenotipicamente como *Vibrio* amplificaram o gene *rpoA*, gerando um fragmento de 242 pb (Figura 7).

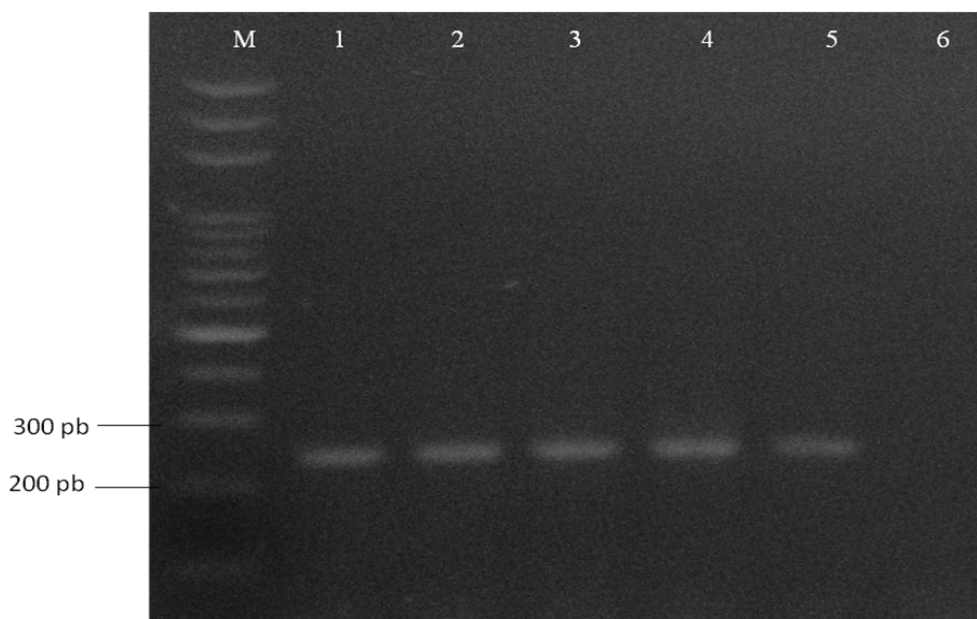


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *rpoA* (242 pb) de bactérias isoladas de mexilhões. **M:** Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). **1-5:** Isolados fenotipicamente caracterizados como *Vibrio* sp. **6:** Branco.

A detecção do gene *rpoA* é considerado um método rápido, sensível e específico para identificação do gênero *Vibrio* e tem sido utilizada em diferentes estudos (THOMPSON et al., 2005; DALMASSO et al., 2009; JEYASEKARAN et al., 2011). A detecção deste gene tem sido utilizada como um teste molecular rápido e capaz de identificar o gênero *Vibrio* a partir de colônias suspeitas sem a necessidade da realização de testes bioquímicos (DALMASSO et al., 2009). De acordo com trabalho realizado por Dalmasso et al. (2009) todos os isolados de *Vibrio* spp. (n=336), provenientes de produtos da aquicultura, na Itália, apresentaram o gene *rpoA*.

4.5.1 Identificação genotípica de *Vibrio parahaemolyticus*

Uma vez confirmado que todos os 209 isolados pertenciam ao gênero *Vibrio* sp., estes foram submetidos a técnica de PCR para detecção do gene *tlh* (hemolisina termolisina), que é espécie-específico para *Vibrio parahaemolyticus* (ROJAS et al., 2011), e dos genes *tdh* (hemolisina termoestável direta) e *trh* (hemolisina termoestável relacionada) que são marcadores de virulência (NORDSTROM et al., 2007; CHEN et al., 2010; ROJAS et al., 2011).

O gene *tlh* foi detectado em 40,6% (85/209) dos isolados, sendo todos estes identificados fenotipicamente como *V. parahaemolyticus*. Em todos os isolados positivos foi

observado um fragmento de 450 pb (Figura 8) e nenhuma outra espécie isolada de *Vibrio* apresentou este gene. O gene *rpoA* foi utilizado nesta reação como controle endógeno.

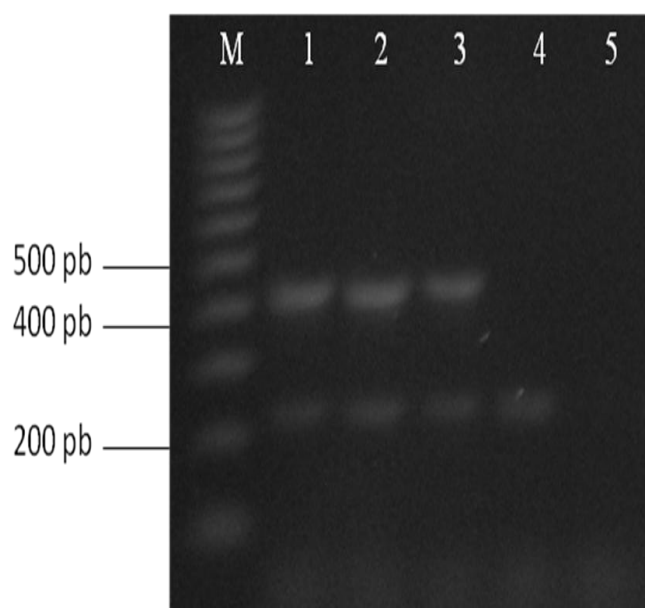


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do *rpoA* (242 pb) e do gene espécie específico de *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*-450 pb) isolados de mexilhão. **M:** marcador de peso molecular (100 pb) Fermentas; **1,2,3:** Isolados de *V. parahaemolyticus*; **4:** Controle negativo: Isolado de *V. vulnificus*; **5:** Branco.

Nordstrom et al. (2007) ao realizarem um PCR multiplex, nos Estados Unidos, em 117 isolados de *Vibrio parahaemolyticus*, relataram que todos os isolados amplificaram o gene *tlh* enquanto que as outras espécies de *Vibrio* testadas (n=36), como *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* foram negativas para este gene. De igual modo, Rojas et al. (2011) detectaram o gene *tlh* nos 23 isolados de *V. parahaemolyticus* provenientes de ostras e moluscos. O gene *tlh* tem sido detectado em todos os isolados clínicos e ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* (ROJAS et al., 2011) e a detecção deste gene tem sido útil como ferramenta para identificação desta espécie (NORDSTROM et al., 2007; ROJAS et al., 2011).

Isolados de *V. parahaemolyticus* podem apresentar os genes *tdh* e *trh*. No presente trabalho, o gene *tdh* foi detectado em 27,7% (58/209) dos isolados de *Vibrio* spp. Do total de 85 isolados de *Vibrio parahaemolyticus*, o gene *tdh* foi detectado em 68,2% (58/85). Em todos os isolados positivos foi observado um fragmento de 269 pb (Figura 9) e nenhuma outra espécie isolada de *Vibrio* amplificou este gene. O gene *tlh* foi usado como controle endógeno da reação. Em relação ao gene *trh*, este não foi detectado em nenhum isolado de *Vibrio* spp.

Estudos relatam que cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* apresentam tanto o gene *tdh* quanto o gene *trh* ou apenas um destes genes (SU et al., 2007; ROJAS et al., 2011) e que apenas 1% a 2% dos isolados ambientais apresentam os genes *tdh* e/ou *trh* (NISHIBUCHI; KAPER, 1995; BHOOPONG et al., 2007). No entanto, De Paola et al. (2003), ao avaliarem a prevalência dos genes *tdh* e *trh* em isolados ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* provenientes de diferentes pontos dos Estados Unidos, detectaram a presença do gene *tdh* em 100% (155/155) dos isolados ambientais e o gene *trh* em 94,1% (146/155) dos isolados. Já no trabalho desenvolvido por García-Cabrera et al. (2004), no Golfo do México, a partir de 266 amostras analisadas, representadas pela água do mar (n=103), peixes (n=88) e ostras (n=75), foi obtido um total de 46 isolados de *Vibrio parahaemolyticus*, sendo o gene *tdh*

detectado em 8,6% (4/46) dos isolados ambientais. O gene *trh* não foi detectado em nenhum isolado.

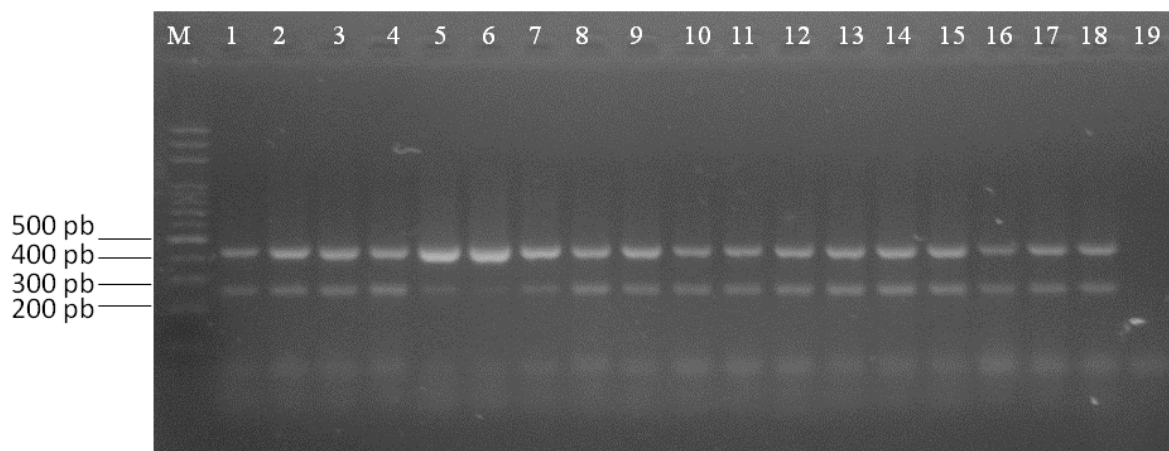


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene espécie específico (*tlh*-450 pb) e do gene de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*-269 pb) isolados de mexilhão. **M:** marcador de peso molecular (100 pb) Fermentas; **1-18:** Isolados de *V. parahaemolyticus*; **19:** Branco.

Caburlotto et al (2008) relataram o isolamento de uma cepa de *V. parahaemolyticus* proveniente de amostra de água marinha em Caleri, na Itália, com potencial pandêmico e com genes de virulência como *tdh* e *trh*. Segundo os autores, esta cepa possui características para potencial doença em humanos, pois carrega características pandêmicas de cepas já isoladas na Europa e Ásia. Esta é a primeira cepa de *V. parahaemolyticus* isolada na região costeira da Itália e o primeiro isolado diretamente a partir de amostra de água do ambiente marinho. Cepas com este potencial já foram isoladas na Espanha (MARTINEZ-URTAZA et al., 2005) e França (QUILICI et al., 2005), sendo estas detectadas a partir de isolados clínicos ou de frutos do mar.

A presença de cepas isoladas do ambiente marinho com marcadores pandêmicos e genes de virulência normalmente associados com isolados clínicos indicam que estas cepas de *V. parahaemolyticus* podem constituir um reservatório de genes de virulência e que podem se disseminar no ambiente marinho. Portanto, estas cepas ambientais devem ser consideradas como potenciais portadores de genes de virulência e representa um risco a saúde humana (CABURLOTTO et al., 2008; CABURLOTTO et al., 2010).

O expressivo percentual de genes *tdh* 68,2% (58/85) a partir de amostras de mexilhões pode estar associada a diversos motivos. No ponto de coleta localizado em Macaé, foi observada a presença de embarcações de suporte às plataformas petrolíferas nesta região e de aves marinhas liberando dejetos orgânicos na água do mar, bem como a lixiviação promovida pelas chuvas nas encostas do arquipélago. Em Angra dos Reis, próximo ao ponto de coleta, foi verificado esgoto sendo lançado na água do mar sem nenhum tratamento prévio e no ponto de coleta em Arraial do Cabo, foi observado a presença de um restaurante flutuante próximo a fazendas de maricultura, o qual recebe diversos turistas, além do crescimento desordenado do mercado imobiliário próximo as praias que podem contribuir para o lançamento de esgoto sem tratamento no ambiente marinho. Diante destes fatos, é possível que a prevalência de *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* positivos esteja associado à contaminação da água do mar por dejetos humanos. Estes achados encontram suporte no trabalho desenvolvido por Cabrera-Garcia et al. (2004) que enfatizaram que a presença de cepas ambientais *tdh* positivas sugerem a possibilidade de contaminação humana de origem fecal no ambiente marinho. Sabendo-se que a literatura relata a transmissão de genes de virulência de *V. parahaemolyticus* através de

plasmídeos e elementos de inserção (BEJ et al., 1999), a detecção dos genes de virulência em isolados ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* pode estar associada com a troca de material genético entre bactérias patogênicas com bactérias ambientais.

Além disso, autores como DePaola et al. (2003) e Nordstrom et al. (2007) relataram que o aumento na detecção de *V. parahaemolyticus* ambientais com genes de virulência é provavelmente devido a utilização de métodos de maior sensibilidade na detecção destes genes.

Um fator que precisa ser avaliado quando se aborda os genes de virulência como marcadores de isolados clínicos é o fato da maioria dos trabalhos serem realizados em países do hemisfério norte. É necessário se ter cautela ao utilizar estes dados para a realidade brasileira, pois as condições bióticas e abióticas de nosso litoral são distintas, além de se cultivar espécies diferentes daquelas encontradas na Europa e nos Estados Unidos, como é o caso do mexilhão *Perna perna* (RODRIGUES et al., 2009).

4.5.2 Identificação genotípica de *Vibrio vulnificus*

Após a detecção do gene *tlh*, que é espécie-específico para *V. parahaemolyticus*, todos os isolados negativos para este gene 59,3% (124/209) foram submetidos a técnica de PCR para detecção do gene *cth* (citolisina-hemolisina), o qual é espécie-específico para *Vibrio vulnificus* (PANICKER & BEJ, 2005).

O gene *cth* foi detectado em 20,9% (26/124) dos isolados, sendo todos estes identificados fenotípicamente como *V. vulnificus*. Em todos os isolados positivos foi observado um fragmento de 386 pb (Figura 10) e nenhuma outra espécie isolada de *Vibrio* apresentou este gene. Resultados semelhantes foram demonstrados por Colodner et al. (2004), em Israel, que detectaram o gene *cth* em todos os 48 isolados de *Vibrio vulnificus* identificados.

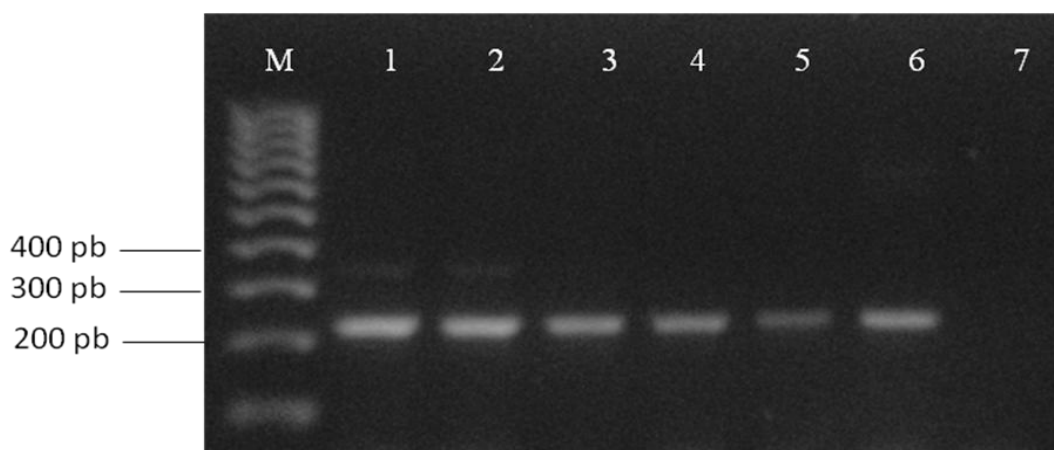


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *rpoA* (242 pb) e do gene de espécie específico *cth* (386-pb) de *Vibrio vulnificus* isolados de mexilhão. **M:** marcador de peso molecular (100 pb) Fermentas; **1-2:** Isolados de *V. vulnificus*; **3, 4, 5, 6:** Isolados de *Vibrio parahaemolyticus*; **7:** Branco.

A literatura relata que a citolisina hemolisina (*cth*) está presente em quase todos os tipos de isolados ambientais de *Vibrio vulnificus*, e é conhecido como um gene espécie-específico (PANICKER & BEJ, 2005).

A realização do PCR visando à identificação de *V. vulnificus* através da detecção do gene *cth* tem sido descrito (DRAKE et al., 2007). Este gene tem sido referenciado também como *vhA* e *hlyA* (HARWOOD et al., 2004).

Embora este gene seja amplamente utilizado e altamente específico para esta espécie, não é capaz de mensurar o potencial de virulência deste micro-organismo, visto que existem outros mecanismos de virulência associados a *V. vulnificus* como a presença da cápsula polissacarídica, de protease/elastase e fosfolipase, as quais podem ser encontradas em quase todas as cepas clínicas e ambientais. De igual modo, também não existem dados disponíveis para determinar a sua sazonalidade e a dose letal humana permanece desconhecida (WHO, 2005).

4.6 Sequenciamento de *Vibrio* spp.

Após a confirmação genotípica de todos os isolados *Vibrio* sp., representantes de algumas espécies foram selecionados e foi realizado o sequenciamento do gene *rpoA*, que codifica a subunidade alfa da RNA polimerase. Cada sequência, que apresentava em média 100 nucleotídeos, foi comparada com seqüências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o algoritmo Blastn.

Os oito isolados seqüenciados pertenciam ao gênero *Vibrio*, apresentando 100% (8/8) de correlação entre a identificação fenotípica e a identificação genotípica por PCR e sequenciamento (Tabela 15).

Tabela 15: Identificação dos isolados de *Vibrio* spp. segundo análise fenotípica, genotípica e o resultado da busca por similaridade no NCBI com o programa Blastn.

Número dos Isolados	Identificação Fenotípica/Genotípica	Alinhamento mais significativo/ Chave de Acesso NCBI	Máxima Identidade (%)	E-value
1	<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i> /EF990363.1	100	9e-51
2	<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i> /EF990363.1	100	3e-45
3	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> /JF907571.1	100	3e-44
4	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> /	100	4e-43
5	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i> /JF907571.1 <i>V. alginolyticus</i> /AJ842630.1	100	6e-05
6	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> /JF907571.1	100	1e-49
7	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. navarrensis</i> /AJ842659.1	98	4e-55
8	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. navarrensis</i> /AJ842659.1	100	8e-46

Quando avaliados em relação à espécie, tal correlação ocorreu em 50% dos isolados (4/8) (Isolados representados pelos números 1, 2, 3 e 4) conforme Tabela 15. Destes quatro isolados, dois foram identificados fenogenotipicamente como *Vibrio parahaemolyticus* através de testes bioquímicos e da presença do gene *tlh*, consoante com o percentual de identidade máxima (100%) com sequências de *Vibrio parahaemolyticus* depositados no NCBI. Associado a isso, um desses isolados também apresentou o gene *tdh*. O gene *tlh* é espécie-específico de *Vibrio parahaemolyticus* e o gene *tdh* é um gene de virulência desta espécie. Os outros dois isolados foram identificados fenotipicamente como *Vibrio mimicus*. Tal identificação foi confirmada através da obtenção de 100% de identidade com a sequência de um isolado de *Vibrio mimicus* disponível no banco de dados do NCBI. Além disso, estes isolados apresentaram resultado negativo quando submetidos a técnica de PCR para detecção de genes alvos de *V. parahemolyticus* (*tlh*) e *V. vulnificus* (*cth*).

Em 50% dos isolados (4/8) não foi possível estabelecer correlação entre a identificação fenotípica e/ou genotípica (PCR) da espécie com o resultado do sequenciamento. Nestes casos, recorreu-se aos testes bioquímicos e a identificação genotípica

baseada em genes espécie-específicos para tentar solucionar as questões referentes à identificação dos isolados.

O isolado número 5 foi identificado fenogenotipicamente como *Vibrio parahaemolyticus*, no entanto, foi observado que sua sequência *rpoA* apresentou 100% de identidade com *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*. Considerando os aspectos biológicos avaliados através da identificação fenotípica conclui-se que se trata de um isolado de *V. parahaemolyticus*, e não de *V. harveyi* ou *V. alginolyticus*, por apresentar-se sacarose-negativo, arabinose-positivo e ornitina-positivo, em conformidade com as características metabólicas desta espécie (Tabela 16) (KONEMAN et al., 2008; NOGUEROLA & BLANCH, 2008). Além disso, a presença do gene *tlh*, marcador específico de *Vibrio parahaemolyticus*, corrobora com a identificação fenotípica.

O isolado número 6 foi identificado fenogenotipicamente como *Vibrio vulnificus*, no entanto, após a análise da sequência *rpoA*, foi encontrada 100% de identidade máxima com *Vibrio parahaemolyticus*. Em relação à identificação fenotípica, *V. vulnificus* é diferenciado de *V. parahaemolyticus* através da prova da lactose e ONPG, onde *V. vulnificus* é positivo e *V. parahaemolyticus* é negativo (Tabela 16) (KONEMAN et al., 2008; NOGUEROLA & BLANCH, 2008). Na identificação genotípica foi detectado o gene *cth*. Sabendo-se que o gene *cth* é encontrado em *Vibrio vulnificus* e não em *V. parahaemolyticus* e que *V. parahaemolyticus* apresenta como gene alvo o *tlh*, não detectado neste isolado, pode-se afirmar, que se trata de um isolado de *V. vulnificus*.

Os isolados 7 e 8 foram identificados como *Vibrio alginolyticus*, no entanto, foi observado 98% e 100% de identidade máxima com *V. navarrensis*, respectivamente. Na identificação bioquímica de *Vibrio alginolyticus* e *V. navarrensis*, a diferenciação é feita pela positividade de *Vibrio alginolyticus* às provas de descarboxilação de lisina e ornitina. Além disso, *V. alginolyticus* cresce em 10% de NaCl e é positivo ao vibriostático O129 (10 µg), o que não é observado em *V. navarrensis* (Tabela 16) (KONEMAN et al., 2008; NOGUEROLA & BLANCH, 2008). Para estes isolados, não foi realizado a detecção de genes espécie-específicos, mas baseado na identificação fenotípica conclui-se que estes isolados são *Vibrio alginolyticus*.

Na edição das sequências no programa Bioedit, foram retiradas as extremidades que apresentavam picos pequenos no eletroferograma, indicando baixa qualidade do sequenciamento. Um dos possíveis fatores da não correlação da identificação fenogenotípica com o resultado da análise da sequência *rpoA* dos isolados 5, 6, 7 e 8 pode ser devido ao pequeno tamanho das sequências de DNA editadas (67, 110, 125 e 103 pb, respectivamente). Desta forma, é possível que o pequeno fragmento analisado seja uma região comum a ambas as espécies. Além disso, o gene *rpoA* tem sido utilizado como marcador de *Vibrio* sp., por tratar-se de um gene conservado dentro deste gênero, sendo possível que não ocorra discriminação entre as espécies mais próximas. Por outro lado, espécies filogeneticamente mais distantes, por exemplo, *V. mimicus*, podem ser discriminadas utilizando este gene (Figura 11). No caso específico do isolado 5, foi observado ainda baixo percentual de cobertura do alinhamento (10-15%) e valor de confiança pouco significativo ($e\text{-value} = 6 \times 10^{-5}$) para caracterizar uma possível similaridade, o que associado ao pequeno tamanho do fragmento indica que esse alinhamento tenha ocorrido ao acaso. Vale ressaltar que o NCBI é um banco de dados público onde a fidelidade dos resultados apresentados é responsabilidade exclusiva do depositário, não havendo qualquer avaliação prévia das sequências disponibilizadas.

Tabela 16. Provas fenotípicas e genotípicas de identificação de espécies do gênero *Vibrio*.

Provas diferenciais	Espécies de <i>Vibrio</i>				
	V. <i>parahaemolyticus</i>	V. <i>vulnificus</i>	V. <i>harveyi</i>	V. <i>alginolyticus</i>	V. <i>navarrensis</i>
Sacarose	+	-	+	+	+
Arabinose	+	-	-	-	-
Lactose	-	+	-	-	-
Descarboxilação ornitina	+	+	+	-	-
Descarboxilação lisina				+	-
Halofilia 10% NaCl	-	-	-	+	-
O/129 (10µg)	R	S	R	R	S
ONPG	-	+	-	-	-
Bioluminescência	-	-	+	-	-
Gene <i>-rpoA</i>	+	+	+	+	+
Gene espécie específica – <i>tlh</i>	+	-	-	-	-
Gene virulência- <i>tdh</i>	+	-	-	-	-
Gene espécie específica- <i>cth</i>	-	+	-	-	-

Legenda: R: Resistente; S: Sensível; +: resultado positivo; -: resultado negativo.

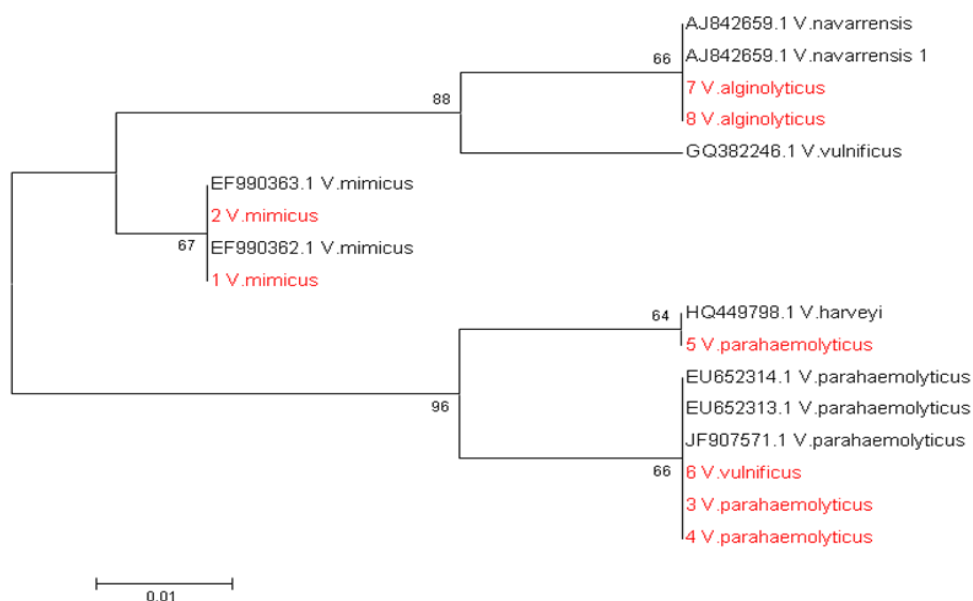


Figura 11: Cladograma obtido pela relação filogenética de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* baseado no gene *rpoA* utilizando o método Neighbor-Joining. Números nos ramos indicam o valor de bootstrap baseado em 1000 replicatas.

5. CONCLUSÕES

- A associação entre humanos, ambientes aquáticos e micro-organismos aponta para a importância de um monitoramento ambiental responsável, através de uma sistemática de controle das cepas circulantes e seus possíveis potenciais patogênicos e significados clínicos.

- Foram identificadas diferentes espécies de *Vibrio* de grande importância econômica para a aquicultura por sua patogenicidade para pescados e moluscos, como *Vibrio anguillarum* e *V. harveyi*.

- *Vibrio parahaemolyticus* foi a espécie prevalente isolada a partir de mexilhões. Este patógeno possui relevância em Saúde Pública, devido a sua capacidade de produzir inúmeros fatores de virulência e estar associado a quadros de gastroenterite após a ingestão de mexilhões.

- A análise do sequenciamento genético em oito isolados de *Vibrio* spp. estudados foi correlata com a identificação fenogenotípica em 50% (4/8). Nos isolados onde não foi possível estabelecer esta correlação (4/8) recorreu-se aos testes bioquímicos e a identificação genotípica baseada em genes espécie-específicos.

- Ao avaliarmos os mexilhões coletados no Arquipélago de Santana é possível inferir que a instalação de cultivos de mexilhões em áreas abrigadas mais afastadas da costa e com uma maior profundidade pode se constituir num ambiente propício à maricultura.

- Arraial do Cabo foi o local que apresentou maior distribuição de enterobactérias, podendo este fato estar associado à presença do restaurante flutuante próximo a fazenda de maricultura bem como a proximidade com a região costeira.

- Dentre os micro-organismos isolados da família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* foi a espécie prevalente e apresenta importância em saúde pública, uma vez que sua detecção indica contaminação de origem fecal e representa risco de gastroenterite após a ingestão de mexilhões.

- A resistência antimicrobiana detectada nos isolados bacterianos pode estar associada ao lançamento de esgoto diretamente no ambiente aquático bem como, estes micro-organismos resistentes podem ter sido carreados através das fezes de aves migratórias e embarcações localizadas próximos aos pontos de coleta.

- Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para o risco relacionado ao consumo de mexilhões, o que pode resultar em infecção humana.

- A detecção de *Aeromonas* é importante, uma vez que este micro-organismo constitui risco para o homem, pois está associada ao surgimento de gastroenterites sob a forma de surtos e também infecções extraintestinais. A incidência de *Aeromonas* spp. no ambiente marinho tem sido alvo de interesse, dada a sua importância em termos de saúde pública.

- A detecção de coliformes termotolerantes da água do mar coletada em Arraial do Cabo aponta para a necessidade de um monitoramento ambiental nesta região, a fim de assegurar a qualidade microbiológica dos mexilhões. O lançamento de dejetos humanos na água do mar, além de contaminar a água pode acarretar na contaminação dos mexilhões.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for hostspecificity and co-evolution of bacteria and hosts. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1343–1347, 2001.
- ABBOTT, S.L.; SELI, L.S.; CATINO, M. JR.; HARTLEY, M.A.; JANDA, J.M. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. **J Clin Microbiol**, v.36, p.1103–1104, 1998.
- ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal Clinical Microbiology**, v.4, n.6, p. 2348-57, 2003.
- ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M.; JOHNSON, J.A.; FARMER, III JJ. *Vibrio* and related organisms. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2007:723-33.
- AHMED, A.M.; NAKAGAWA, T; ARAKAWA,E.; RAMAMURTHY, T.; SHINODA, S.; SHIMAMOTO, T. New aminoglycoside acetyltransferase gene, aac(3)-Id, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. **J. Antimicrob. Chemother**, v.53, n.(6), p. 947-951, 2004.
- ALFARO, A. C. Effect of water flow and oxygen concentration on early settlement of the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. **Aquaculture**, v.246, p.285-294, 2005.
- ALTEKRUSE, S.F.; BISHOP, R. D.; BALDY, L.M.; THOMPSON, S.G.; WILSON, S.A.; RAY, B.J.; GRIFFIN, P.M. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. **Epidemiol. Infect.** v.124, p.489-495, 2000.
- ALTSCHUL, S.F.,; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v.25, p.3389-3402, 1997.
- AKINBOWALE, O.L.; PENG, H. & BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **J. Appl. Microbiol.**, v.100, p.1103-1113, 2006.
- ANDREATTA, E. R. A experiência do Estado de Santa Catarina no desenvolvimento da Maricultura. Instituto de Pesca/APTA/SAA – Ser. Relat. Téc. n.03, p. 50-53, 2000.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de janeiro de 2001. n.7, seção 1, p. 45-53, 2001.
- ARANA, L.V. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas públicas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. **UFSC**, Florianópolis, SC, 1999.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.33, n.(2), p.775-790, 2012.

AUSTIN, B., ZHANG, X.H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrate and invertebrate. **Lett. Appl. Microbiol.** v.43, p.119-124, 2006.

BALEBONA, M. C., ANDREU, M. J., BORDAS, M. A., ZORRILLA, I., MORIÑIGO, M. A., BORREGO, J.J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for culture gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p. 4269-4275, 1998.

BAFFONE, W.; PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; BARBIERI, E.; CITTERIO, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, p.9-18, 2000.

BARBONI, S.A.V. Ocorrência de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia-Brasil. Doutorado em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2003, p. 171.

BASTOS, R. K. S. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, n.(1), p.1-11, 2000.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M. Processamento e industrialização de moluscos. **Tecnologias para o aproveitamento legal do pescado**, Campinas p.38-84, 2000.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e workshop tecnologias para aproveitamento integral do pescado. Campinas. **Anais**. p. 38-84. 2000.

BEJ, A.K.; PATTERSON, D.P.; BRASHER, C.W.; VICKERY, M.C.; JONES, D.D.; KAYSNER, C.A. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. **J Microbiol Methods**. v.36, n.(3), p.215-25, 1999.

BELTRÃO, M. Arqueologia do Estado do Rio de Janeiro, Arquivo Público do Rio de Janeiro, 1995.

BERRE, J.C.L. Promesses de l'aquaculture. **Le Monde Diplomatique**, p. 15,1995.

BHUIYAN, N. A., ANSARUZZAMAN, M., KAMRUZZAMAN, M., ALAM, K., CHOWDHURY, N. R., NISHIBUCHI, M., FARUQUE, S. M., SACH, D.A., TAKEDA, Y., NAIR, G. B. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p. 284-286, 2001.

BLACKSTONE, G.M.; NORDSTROM, J.L.; VICKERY, M.C.; BOWEN, M.D.; MEYER, R.F.; DEPAOLA, A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. **J Microbiol Methods**. v.53, p.149–155, 2003.

BLAKE PA. Epidemiology of cholera in the Americas. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.22, p. 639-660, 1993.

BOOTH, N., McDONALD, L.E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 997 p.

BOYD, E.F.; MOYER, K.E.; SHI, L; WALDOR, M.K. Infectious CTXphi and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. **Infect Immun**. v.68, p.1507–1513, 2000.

BRANDINI, F.P.; SILVA, A.S.; PROENÇA, L.A.O. Oceanografia e maricultura. *In*: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A; BORGHETTI, J.R. Aquicultura no Brasil. Brasília: CNPq, p.107-142, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União de 18 setembro 2003.

BRAUNS, L.A.; HUDSON, M.C.; OLIVER, J.D. Use of the Polymerase Chain Reaction in Detection of Culturable and Nonculturable *Vibrio vulnificus* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.(9), p.2651-2655 1991.

BRAVO, L. MONTÉ, R., SILVA, M., RAMIREZ, M, GARCIA, B., FERNANDEZ, A., ROSSOLINI, G., GUGGLIELMETTI, P. Acute diarrhea associated with heat stable enterotoxin producing strains of *Vibrio cholerae* non O1: First report from Cuba. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.255-256, 1998.

BRYAN, P.J., STEFFAN, R.J., DePAOLA, A., FOSTER, J.W., BEJ, A.K. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. **Current Microbiology**, v.38, p.168-175, 1999.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n.(3), p.969-76, 2010.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS A.C.V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases** v.4, n.(4), p.201-212, 2004.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ. Microbiol**. v.8, n.(7), p.1137-1144, 2006.

CABRERA-GARCIA, M. E.; VASQUEZ-SALINAS, C.; QUINONES-RAMIREZ, E. I. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of Gulf of Mexico. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.(11), p.6401-6406, 2004.

CALIF, E., PICK, N., DREYFUSS, U., STAHI, S. Upper extremity infections following common carp fish (*Cyprinus carpio*) handling. **Journal of Hand Surgery**, 27B: v.1, p.78-82, 2002.

CALIXTO, F.A.A. Avaliação dos parâmetros bacteriológicos em Mexilhão, *Perna perna*, de mitilicultura da Baía de Ilha Grande, RJ, submetidos a irradiação gama. Universidade Federal Fluminense, Mestrado em Medicina Veterinária, 2010, 98p.

CAMPBELL, M.S.; WRIGHT, A.C. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* v.69, p.7137-7144, 2003.

CARNAHAN, A.M.; HARDING, J. WASTKY, D.; HANSMAN, S. Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1805-1806, 1994.

CARBULOTO, G.; GHIDINI, V.; GENNARI, M.; TAFI, M.C; LLEO, M.M. Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. **Eurosurveillance**. v.13, p.1-3, 2008.

CARDONHA, A. M. S. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **International Microbiology**, v.7, n.(3), p.213-218, 2004.

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

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUEIRAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ- RENDÓN, E.; APARICIO, G.O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M.R. Characterisation of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.41-49, 2003.

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

CASTRO, M.R.S.; FREIRE, I.G.M.; ESCOBAR, C.A.M.; ANTUNES, G.M.; FARO, Z.P. Influência da contaminação ambiental nas condições higiênico-sanitária do peixe Curimã oriundo da favela do Caranguejo, Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.17, p.54-61, 2003.

CAVALLO, R.A., STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Research**, v.36, p.3719-26, 2002.

CERDÀ-CUÉLLAR, M.; PERMIN, L.; LARSEN, J. L.; BLANCH, A. R. Comparison of selective media for the detection of *Vibrio vulnificus* in environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.322-327, 2001.

CHAKRABORTY, S.; NAIR, G.B.; SHINODA, S. Pathogenic vibrios in the natural aquaculture environment. **Review in Environmental Health**, v.12, p.63-80, 1997.

CHEN, Y.; LIU, X.; YAN, J.; LI, X.; MEI, L.; MA, Q.; MA, Y.I. Foodborne Pathogens in Retail Oysters in South China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.23, p.3236, 2010.

CHIEN, J.Y.; SHIH, J.T.H.; SUEH, P.R.; YANG, P.C.; LUH, K.T. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.21, p.401-403, 2002.

CLARK, N.M.; CHENOWETH, C.E. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Disease**, v.37, p.506-513, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **CLSI**, Wayne, Pa, 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S21. **CLSI**, Wayne, Pa, 2011.

CORDEIRO, D.; LOPES, T.G.G.; OETTERE, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J.A. Qualidade do mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. **CEPPA**, Curitiba, v. 25, n.(1), 2007.

CÔGO, P.P. Comparação de genomas completos de espécies da família Vibrionacea empregando rearranjo de genomas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Computação, 2008, 59p.

COLAKOGLU, F.A.; SARMAŞIK, A.; KOŞEOGLU, B. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. **Food Control**, v.17, n.(8), p. 648-652, 2006.

COLODNER, R.; RAZ, R.; MEIR, I.; LAZAROVICH, T.; LERNER, L.; KOPELOWITZ, J. KENESS, Y.; SAKRAN, W.; KEN-DROR, S.; BISHARAT. Identification of the Emerging Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods. **J Clin Microbiol.** v.42, n.(9), p.4137-4140, 2004.

COLWELL, R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. **Science**, v.274, p.2025-31, 1996.

CONWAY, D.J.; ROPER, C. Micro-evolution and emergence of pathogens. **International Journal for Parasitology**, v.30; p.1423-1430, 2000.

COOK, D.W. Refrigeration of oyster shellstock conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. **Journal of Food Protection**, v.60, p.349-352, 1997.

COOK, D. W. Molluscan, shellfish: oysters, mussels and clams. In DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA, p.507- 514, 2001.

COSTA, M.M.; PEIXOTO, R.M.; BOIJINK, C.L.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A.C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesq. Vet. Bras.** v.28, n.(10), p. 477-480, 2008 (a).

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. Susceptibilidade “In Vitro” A Antimicrobianos de Estirpes de *Vibrio* spp Isoladas de Camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de Água de Criação Destes Animais Provenientes de uma Fazenda de Camarões no Ceará, Braz. **J. vet. Res. anim. Sci.** v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008 (b).

DALMASSO, A.; LA NEVE, E.; CROCI, L.; SERRACCA, L.; BOTTERO, M.T.; CIVERA, T. Development of a PCR Assay Targeting the *rpoA* Gene for the Screening of *Vibrio* Genus. **Food Analytical Methods**, v.2, n.(4), p. 317-324, 2009.

DANIELS, N.A.; RAY, B.; EASTON, A.; MARANO, N.; KAHN, E.; MCSHAN, A.L.; DEL ROSARIO, L.; BALDWIN, T.; KINGSLEY, M.A.; PUHR, N.D.; WELLS, J.G.; ANGULO, F.J. *Vibrio vulnificus* and a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. **JAMA**, v.284, n.(12), p.1541-45, 2000.

DePAOLA, A.; MCLEROY, S.; MCMANUS, G. Distribution of *Vibrio vulnificus* phage in oyster tissues and other estuarine habitats. **Journal of Food Protection**, v.63; p.2464-2467, 1997.

DePAOLA, A.; ULASZEK, J.; KAYSNER, C.A.; TENGE, B.J.; NORDSTROM, J.L.; WELLS, J.; PUHR, N.; GENDEL, S.M. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, p.3999–4005, 2003.

DENKIN, S. M.; NELSON, D. R. Regulation of *Vibrio anguillarum empA* metalloprotease expression and its role in virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.(7), p.4193-4204, 2004.

DEVRIESE, L.; VANCANNEY, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **Int. J. System. Evolution. Microbiol.** v.55, p.1569-1573, 2005.

DIAS, M.T.; SANTOS, P.C.R.F.; OLIVEIRA, L.A.T.; MARIN, V.A. Evaluation of antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* strains isolated from mussels (*Perna perna linnaeus 1758*.) **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, v.30, n.(2), p.319-324, 2010.

DIXIT, S.M.; GORDON, D.M.; WU, X.Y.; CAPMAN, T.; KAILASAPATHY, K.; CHIN, J.J.C. Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* – associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. **Microbiology**, v.150, p.1735-1740, 2004.

DRAKE, S.L.; DEPAOLA, A.; JAYKUS, A.A. An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Comprehensive Reviews In: **Food Science And Food Safety**, v.6, p.120-143, 2007.

DULVY, N.K.; SADOVY, Y.; REYNOLDS, J.D. Extinction vulnerability in marine populations. **Rev Fisher and Fisheries**, v.4, p.25-64, 2003.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. A Embrapa e a Aquicultura. Demandas e prioridades de pesquisa. Brasília: **Embrapa, Informação Tecnológica**, 2002. 35 p.

EPAGRI –UFSC, ROSA, R. de C.; FERREIRA, J.F.; PEREIRA, A.; MAGALHÃES, A. R. M.; NETO, F. M. de O.; GUZENSKI, J.; ANTONIOLLI, M. A.; FILLIPPI, L. M. N.; RODRIGUES, P. de T. R.; OGLIARI, R.O. **Manual Biologia e Cultivo de Mexilhões, Florianópolis**, 2000, p. 55.

European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3 - Management of scientific committees II23 September 2001.

FAGUNDES, L.; GELLI, V.C.; OTANI, M.N.; VICENTE, M.C.M.; FREDO, C.E. Perfil sócio-econômico dos mitilicultores do litoral paulista. **Inf. Econ., São Paulo**, v.35, n.(5), p. 47-59, 2004.

FAMASC, Maricultura em Santa Catarina. 2002. Disponível em <http://www.bsi.com.br/unilivre/centro/experiencias/experiencias/405.html>. Acesso em: 30/08/2008.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO, n.334, 1997. 176 p. FAO Documento Técnico sobre as Pescas. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P00.html>. Acesso em: jun. 2012.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture, 2008. Disponível em: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2012.

FARMER, I.I.I.; JANDA, M.; BRENNER, F.W.; CAMERON, D.N.; BIRKHEAD, K.M. GENUS I. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's manual of systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria*. 2nd ed. New York: Springer; v. 2, p. 494-546, 2005.

FARUQUE, S.M; NAIR, G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol Immunol**, v.46, p.59-66, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) 2004 - **Bacteriological analytical manual**. On line version. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>. Acesso em 30/08/2008.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborn diseases. **Microbes and Infection**, v.2, p.1651-1660, 2000.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: **FDA bacteriological analytical manual online**, sep. 2002. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebem/bam-4a.html>. Acesso em 28 julho 2008.

FERNANDEZ-DELGADO, M.; CONTRERAS, M.; GARCIA-AMADO, M.A.; GUENEAU, P.; SUAREZ, P. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of venezuelan oysters. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.49; n.(6), p.355-359, 2007.

FALCONER, I.R. Algal toxins in sea foods and drink water. **Academici Press**, 108p. 1993.

FAMASC, 2002. Maricultura em Santa Catarina. Disponível em <http://www.bsi.com.br/unilivre/centro/experiencias/experiencias/405.html>. Acesso em: 30/08/2011.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783–791, 1985.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M., Cultivo de mexilhões em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, v.14, p.10-11, 1992.

FIPERJ – Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em www.fiperj.rj.gov.br. Acesso em 05/08/2008.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: **Artmed**, 2002. 424p.

FRANCO, H. M. Santa Catarina é o maior produtor nacional de mexilhões. **Agropecuária Catarinense**, v. 6, n.(3), p.45- 48, 1993.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. S. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILLIOTIS, M. D.; BIER, J. W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker, New York, p.733-743, 2003.

FREITAS, M.. Incrustações biológicas no mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia), cultivado na Ilha de Ratores, SC: Efeito da exposição ao ar. Santa Catarina, Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, (1997), 231p.

FUENTEFRIA, D.F.; FERREIRA, A.E.; GRAF, T.; CORCAO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, n.(5), p.470-47, 2008.

FUJINO, T.; SAKAZAKI, R.; TAMURA, K. Designation of the type strains of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.24, p.447-449, 1974.

FUKUI, Y., SAWABE, T. Rapid detection of *Vibrio harveyi* in Seawater by Real-Time PCR. **Microbes Environ.** v.23, n.(2), p.172-176, 2008.

FUKUSHIMA, H.; TSUNOMORI, Y.; SEKI, R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.5134–5146, 2003.

FURLAN, E.F. Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Piracicaba, 2004, Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, 108 p.

GALVÃO, J.A. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Dissertação (Mestrado) 2004. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) – Universidade de São Paulo, 109p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: **Varela**, 2001.

CHANG, B.; TANIGUCHI, H.; MIYAMOTO, H. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. **J. Bacteriol.** v.180, p. 5094-5101, 1998.

GIBOTTI, A.; SARADAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C.; FALCÃO, D.P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). **Journal Applied Microbiology**, v.89, p.70-75, 2000.

GIL, A.I.; MIRANDA, H.; LANATA, C.F.; PRADA, A.; HALL, E.R.; BARRENO, C.M. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **Int J Infect Dis.** v.11, n.(15), p.324-8, 2007.

GLASS, R.I.; CLAESON, M.; BLAKE, P. Cholera in Africa: Lessons on Transmission and Control for Latin America. **The Lancet**, v.338, n.877, p.791-795, 1991.

GONZALEZ, E.N.; CACHICAR, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M.L.; VERGARA, J.A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. **Emerging Infectious Disease**, v.11, p.129-131, 2005.

GOTTING, K.J. Malakozoologie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1974, 320p.

GRANUM, P.E.; O’SULLIVAN, K.; TOMÁS, J.M.; ORMEN, O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.21, p.131-37, 1998.

GULIG, P.A.; BOURDAGE, K.L.; STARKS, A.M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **J. Microbiol.** v.43, p.118-131, 2005.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p. 95-98, 1999.

HALOW, K.D.; HARNER, R.C. FONTENELLE, L.J. Primary skin infections secondary to *Vibrio vulnificus*: the role of operative intervention. **J. Am. Coll. Surg.** v.183, p.329-334, 1996.

HAMAP – High-quality Automated and Manual Annotation of microbial Proteomes. url: <http://www.expasy.ch/sprot/hamap/index.html>. Último acesso em 20 de agosto de 2012.

HANEKAMP, J.C.; BERGKAMP, L. Reach y el principio precautorio: costos y beneficios de la legislación propuesta por la EU. Disponível http://www.policynetwork.net/uploaded/pdf/cap8-salud_medioambiente.pdf. Acesso em 16/08/2008.

HARF-MONTEIL, C.; FLÈCHE, A.L.; RIEGEL, P.; PRÉVOST, G.; BERMOND, D.; GRIMONT, P.A.D.; MONTEIL, H. *Aeromonas simiae* sp. Nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.481-485, 2004.

HARWOOD, J. V.; WHITLOCK; WITHINGTON, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.(9), p. 3698-3704, 2000.

HARWOOD, V.J.; GANDHI, J.P.; WRIGHT, A.C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **J Microbiol Methods**, v.59, p.301-16, 2004.

HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P. & WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **Journal Microbiology Methods**, v.59, n.(3), p.301-316, 2004.

HAYAT MAHMUD, Z. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel Japan. **Microbiological Research**, v.161, n.(1), p.25-37, 2006.

HEELAY, J.S. A fatal case of *Vibrio vulnificus* infection in an alcoholic male. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.23, p.18, 2002.

HEIDELBERG, J.F.; HEIDELBERG, K.B.; COLWELL, R.R. Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.5498-507, 2002.

HEITMANN, I.G.; JOFRE, L.M.; HORMAZABAL, O.J.C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, v.22, p.131-140, 2005.

HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; ZAMARIOLLI, L.A.; FAUSTINO, J.S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) coletado nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista. **Arquivos de Ciências do Mar, UFCE – LABOMAR, Fortaleza**, v.33, p.69-76, 2000.

HENRIQUES, M. B. Avaliação dos bancos naturais do mexilhão *Perna perna* (L., 1758) na baía de Santos, Estado de São Paulo. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2001.

HENRIQUES, M.B.; MARQUES, H.L.A.; PEREIRA, O.M.; LOMBARDI, J.V. Resistência do mexilhão *Perna perna* a baixas salinidades e sua relação com a contaminação bacteriológica. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v.32, n.(2), p.107-114, 2006.

HENTSCHER, U.; STELNERT, M.; HACKER, J. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. **Trends Microbiol**, v.8, p.226–231, 2000.

HERNANDÉZ, C.; ULLOA, J.; VERGARA, J.A.; ESPEJO, R.; CABELLO, F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile. **Rev Med Chil**. v.133, n.(9), p.1081-8, 2005.

HOASHI, K.; OGATA, K.; TANIGUCHI, H.; YAMASHITA, H.; TSUJI, K.; MIZUGUCHI, Y. & OHTOMO, N. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice. **Microbiology and Immunology Journal**, v.34, p.355-366, 1990.

HØI, L.; LARSEN, J.; DALSGAARD, L. I., DALSGAARD, A.. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.7-13, 1998.

HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; BAKER, C.N.; THORNSBERRY, C. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. **Journal Clinical Microbiology**, v.3, n.(4), p. 425-431, 1976.

HONDA, T.; LAPUEBLA, M.A.A.; NI, Y.; YAMAMOTO, K. Characterization of a new thermostable direct haemolysin produced by Kanagawa-phenomenon negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Gen. Microb.**, v.137, n.(2), p.253-9, 1991.

HONDA, T.; IIDA, T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. **Rev. Med. Microbiol**. v.4, p.106-113, 1993.

HONG, G.E.; KIM, D.G.; BAE, J.Y.; AHN, S.H.; BAI, S.C.; KONG, I.S. Species-specific PCR detection of the ϕ sh pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the amiB gene, which encodes N -acetylmuramoyl-L-alanine amidase. **FEMS Microbiol Lett**, v.269, p.201–206, 2007.

HÖRMANSDORFER, S.; WENTGES, H.; NEUGEBAUR-BÜCHER, K.; BAUER, J. Isolation of *Vibrio alginoliticus* from seawater aquaria. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.203, p.169-175, 2000.

HORRÉ, R.; MARKLEIN, G. SCHAAL, K.P. *Vibrio vulnificus*, an emerging human pathogen. **Bacteriology**, v.28, p.273-284, 1996.

HUANG, K.C.; HSU, R.W.W. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitid and cerebritis. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.75-77, 2005.

- HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K.F.; ROSSEN, L.; NIELSENAND, T.; GRAM, L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal Applied Microbiology**, v.96, n.(117), p.117-132 , 2004.
- HUSS, H.H.; ABABOUCHE L.; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. Fisheries technical paper N°44. **Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO)**, Rome, 2004.
- JAKSIĆ, S.; UHITIL,S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L.G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v.13, p.491-93, 2002.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.
- JEYASEKARAN, G.; RAJ, K.T.; SHAKILA, R.J.; THANGARANI, A.J.; SUKUMAR, D. Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the specific detection of toxin-producing *Vibrio cholerae* in fish and fishery products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n.(3), 2011.
- JONES, M.K.; Oliver, J.D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. **Infect Immun**, v.77, p.1723-1733, 2009.
- JOSEPH, S.W.; CARNAHAN, A.M.; BRAYTON, P.R.; FANNING, G.R.; ALMAZAN, R.; DRABICK, C.; TRUDO, J.; COLWELL, R.R. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.565-569, 2000.
- KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños com claves para su determinación y notas sobre su distribución. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.37 (supl.), p.327-352, 1964.
- KENNEDY, D. G. Nitrofurans in Poultry. S.A.M.P.C.A. meeting, Fatima (May, 21) (*personal communication*), 2003.
- KENT, M.L.; POPPE, T.T. Infectious diseases of coldwater fish in marine and brackish water. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W., Lim, L.H.S. Eds. Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture. **CAB International Publ.** v.7; p.61-105, 2002.
- KIM, Y.H.; JUN, S.H.; YOON, S.H.; CHUNG, J.J.; KIM, J.C.; JEONG, H.D. Prevalence of tet(B) and tet(M) genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environments of Korea. **Dis Aquat Organ.** v.9, n. (3), p.209-16, 2007.
- KIM, D.G.; AHN, S.H.; KIM, L.H.; PARK, K.J.; HONG, Y.H.; KONG, I.S. Application of the rpoS Gene for Species-Specific Detection of *Vibrio vulnificus* y Real-Time PCR. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.18, n.(11), p.1841-1847, 2008.

- KIM, Y.R.; KIM, B.U.; KIM, S.Y.; KIM, C.M.; KOH, J.T.; CHOV, H.E.; RHEE, J.H.; LEE, S.E. Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytolysin-hemolysin *vvhA* into epithelial cells to induce cytotoxicity. **Biochem Biophys Res Commun.** v.399, n.(4), p.607-612, 2010.
- KINGOMBE, C.I.B.; HUYS, G, HOWALD D,LUTHI E, SWINGS J, JEMMIT. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas spp.* Harboring virulence markers in foods. **International Journal of Microbiology**, v.94, p.113-121, 2004.
- KIRKAN, S.; GÖKSOY, E.Ö.; KAYA, O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in turkey hatchery farms. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.50, n.(7), p. 339-344, 2003.
- KWOK, A.Y.; WILSON, J.T.; COULTHART, M.; NG, L.K.; MUTHARIA, L.; CHOW, A.W. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial hsp60 gene sequences. **Can J Microbiol**, v.48, p.903–910, 2002.
- KOELLE, K.; PASCUAL, M.; YUNUS, M. Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change. **Proc. Biol. Sci.**, v.272, n.(1566), p.971-977, 2005.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008, 1565p.
- KOTHARY, M.H.; LOWMAN, H.; MCCARDELL, B.A.; TALL, B.D. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. **Infect. Immun**, v.71, p.3213-3220, 2003.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** v.5, p.150-163, 2004.
- KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.54, n.(2), p.311-320, 2004.
- KÜPLÜLÜ, Ö.; GÖNCÜOĞLU, M.; ÖZDEMİR, H.; KOLUMAN, A.. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. **Food Control**, v.17, p.222-224, 2006.
- LAI, C.H.; HWANG, C.K.; CHIN, C.; LIN, H.H.; WONG, W.W.; LIU, C.Y. Severe watery diarrhea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. **Journal of Infection.** v.52, n.(2), p.95-98, 2006.
- LAM, T.; WONG, C. Review of notifiable diseases in 2008. **Public Health Epidemiol Bull.** v.18, n.(2), p.31-42, 2009.
- LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 10, n.(4), p. 48-57, 2008.

- LEHANE, L.; RAWLIN, G.T. Tropically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. **Med. J. Aust**, v.173, p.256-259, 2000.
- LEE, K. K.; LIU, P. C.; CHUANG, W. H. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. **Mar. Biotechnol.**, v.4, n.(3), p. 267-277, 2002.
- LEE, R. J.; MORGAN, O. C. Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. **Water Science and Technology**, v. 47, n. (3), p. 65-70, 2003.
- LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink NH microwell plate sandwich hybridization. **J Microbiol Methods**, v.53, p.199–209, 2003.
- LEE, J.H.; KIM, M.W.; KIM, B.S.; KIM, S.M.; LEE, B.C.; KIM, T.S.; CHOI, S.H. Identification and Characterization of the *Vibrio vulnificus rtxA* Essential for Cytotoxicity *in vitro* and Virulence in Mice, **Microbiological Society of Korea**, v.45, n.(2), p.146-152, 2007.
- LEITE, B.R. Isolamento e identificação de bactérias bioluminescentes de animais e de ambientes naturais marinhos de Imbé e Tramandaí, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil, 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Curso de Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira: Bacharelado, 83p.
- LESMANA, M.; SUBEKTI, D.S.; TJANIADI, P.; SIMANJUNTAK, C.H.; PEENJALOI, N.H.; CAMPBELL, J.R.; OYOJO, B.A. Spectrum of vibrio species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, p.91-97, 2002.
- LIGHTNER, D. V. Disease of culture penaeid shrimp. In: **Handbook of Mariculture Crustacean Aquaculture**, CRC Press, Boca Ráton, 1996.
- LINDNER, G. **Moluscos y caracoles de los mares del mundo**. Aspecto/Distribución/Sistemática. Tercera edición. Barcelona: Ed. Omega, S.A., 1989, 236p.
- LIRA, A. *Vibrio Parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.15, n.(90), p.91, 2001.
- LIPP, E.K.; ROSE, J.B. The role of seafood in foodborne diseases in the USA. Contamination of Animal Products: Prevention and Risks for Public Health. **Office International des Epizooties Review**, v.16, n.(2), p.620-640, 1997.
- LLEÒ, M.M. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, n.(6), p.1095-1102, 2001.
- LOPES, C. M.; RABADAO, E. M.; VENTURA, C.; CUNHA, S. da; CORTE, R. R. MELICO, A. A. S. A case of *Vibrio alginolyticus* bacteremia and probable sphenoiditis following a dive in the sea. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p.299-300, 1993.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da Reprodução dos Mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca Lamellibranchia). Bolm. Fac. Filos. Cienc. Univ. São. Paulo, Zool. Biol. Mar., n.s., 26: 33-111, 1969.

LYNCH, T.; LIVINGSTONE, S.; BUENAVENTURA, E.; LUTTER, E.; FEDWICK, J.; BURET, A.G.; GRAHAM, D.; DEVINNEY, R. *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. **Infect Immun** v.73, p. 1275-1283, 2005.

MACEDO, J.A.B. Águas e águas. 3 edição. Belo Horizonte, 2007. CRQ-MG, 1027p.

MACHADO, I.C; PAULA, A.M.R.; BUZZO, A.; JAKABI, M.; RISTORI, C.; SAKUMA, H. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*): análise de ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). **Higiene Alimentar**, São Paulo: Impress, v.15, n.(83), p.44-48, 2001.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; TATENO, S. *Vibrio cholerae* non-O₁ isolated from sporadic cases of diarrhea in Recife, Brazil. **Revista de Microbiologia São Paulo**, v. 23, p.1-4, 1992.

MAGALHÃES, V.; CASTELLO, A. F.; MAGALHÃES, M.; GOMES, T. T. Laboratory evaluation on pathogenic potentialities of *Vibrio furnissii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.593-97, 1996.

MAKINO, K.; KUROKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; UDA, T.; TAMAGORI, K.; IIMA Y.; NAJIMA, M.; NAKANO, M.; YAMASHITA, A.; KUBOTA, Y.; KIMURA, S.; YASUNAGA, T.; HONDA, T.; SHINAGAWA, H.; HATTORI, M.; IIDA, T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **Lancet**, v.1, p.743-9, 2003.

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**. v.1, n.(4), p.201-206, 2005.

MARTINEZ-URTAZA, J.; SIMENTAL, L.; VELASCO, D.; DEPAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; CARRERA-FLORES, D.; REY-ALVAREZ, C.; POUSA, A. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. **Emerg Infect Dis**. v.11, p.1319-1320. 2005.

MARTINEZ, Diego Igawa and OLIVEIRA, Ana Júlia Fernandes Cardoso de. Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. **Braz. j. oceanogr.** v.58, n.(3), 2010.

MARQUES, H.L.A. Considerações ecológicas sobre o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em bancos naturais da região de Ubatuba, São Paulo, Brasil. Campinas, Dissertação (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1988), 108p.

MARQUES, H.L.A.; LIMA, PEREIRA, R.T.; CORREA, B.C. Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L.) cultured in Ubatuba, Brazil. **Aquaculture**, v.169, n.(2), p.263-73, 1998.

MATSUMOTO, C.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMAMURTHY, T.; WONG, H.C.; DEPAOLA, A.; KIM, Y.B.; ALBERT, M.J. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Spread, France. **Emerg Infect Dis.** v.11, n.(7), p.1148–1149, 2005.

NAIM, R.; IIDA, T.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T. Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells. **FEMS Microbiol. Lett.** v.196, p. 99-105., 2001.

NAKA, H.; DIAS, G.M.; THOMPSON, C.C.; DUBAY, C.; THOMPSON, F.L.; CROSA, J.H. Complete Genome Sequence of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Harboring the pJM1 Virulence Plasmid and Genomic Comparison with Other Virulent Strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. **Infect Immun.** v.79, n.(7), p.2889–2900, 2011.

NISHIBUCHI, M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.578-585, 2000.

MATTÉ MH. Aplicação de Métodos Moleculares no Estudo de Organismos de Gênero *Aeromonas*. São Paulo, 2004. Tese de Livre-Dôcência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP, 138p.

MATTÉ, M.H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M.; 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.** v.18, p.747-51, 2007.

MATTICK, K.L.; DONOVAN, T.J. The risk to public health of *Aeromonas* in ready-to eat salad products. **Communicable Disease Public Health**, v.1, p.267-70, 1998.

MAUGERI, T.L.; CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic *Vibrios* in brackish waters and mussels. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.261-246, 2000.

MAYER, C.C.S. Detecção molecular e resistência aos antimicrobianos no grupo *Vibrio fluvialis* – *Vibrio furnissii*. Programa de pós Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP, Mestrado, 2010, 96p.

MENDES, E.S.; ALVES, C.A.B.; BEZERRA, S.S.; MENDES, P.P.; SANTOS, F.L. Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na grande recife, PE.. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n(2), p.116-117, p.79-87, 2004.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, v.212, n.(1), p.31-47, 2002.

MIYOSHI, S.; HIRATA, Y.; TOMOCHIKA, K.; SHINODA, S. *Vibrio vulnificus* may produce a metalloprotease causing an edematous skin lesion in vivo. **FEMS Microbiology**

Letters, v.121, p.321-326, 1994.

MONETTO, A.M.; FRANCAVILLA, A.; RONDINI, A.; MANCA, L.; SIRAVEGNA, M.; FERNANDEZ, R. A study of botulinum spores. **Anaerobe**, v.5, p. 185-186, 1999.

NARCKEVICH, M.I.; ONISCHENKO, G.G.; LOMOV, J.M. The Seventh Pandemic of Cholera in the USSR, 1961-89. **Bulletin of the World Health Organization**, v.71, n.(2), p.189-196, 1999.

MORAES, L.E.O. A cooperação na cadeia produtiva da Maricultura do Estado de São Paulo. Tese de doutorado: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2005.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR)- *Vibrio* Illnesses after Hurricane Katrina—Multiple States, August-September 2005. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5437a5.htm> Acesso em 1/10/2008.

MOREIRA, A.S.; LEÃO, M.V.P.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C.; SILVA, C.R.G.; Qualidade sanitária da água e de bivalves *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) na praia do Jabaquara, Paraty, RJ. **Revista Biociências, Unitau**, v.17, n.(1), p.66-71, 2011.

MORELLI, A. M. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; REIS, C. M. F.; RODRIGUES, D. P.; FONTELES-FILHO, A. A. Indicadores de contaminação fecal para ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. **Higiene Alimentar**, v.17, n.(113), p.81-88, 2003.

MORENO, M. L. G.; LANDGRAF, M. Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains from seafood. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.747-751, 1998.

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. **Atlantic Canadian Society for Microbial Ecology**, Halifax, Canada. v.5, p.237-243, 1999.

MORIARTY, D. J. W. Os perigos do uso de antibióticos na aquicultura. 2003. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br/article.php>>. Acesso em: 08/07/2008.

NAIR, G.B.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S.K.; DUTTA, B.; TAKEDA, Y.; SACK, D.A. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. **Clin Microbiol Rev.** v.20, p.39-48, 2007.

NAKAGUCHI, Y.; OKUDA, J.; IIDA, T.; NISHIBUSCHI, M. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH related hemolysin gene. **Microbiology of Immunology**, v.47, p.233-239, 2003.

NARCKEVICH, M.I.; ONISCHENKO, G.G.; LOMOV, J.M. The Seventh Pandemic of Cholera in the USSR, 1961-89. **Bulletin of the World Health Organization**, v.71, n.(2), p.189-196, 1993.

NASCIMENTO, S.M.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, G.H.F. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, p.263-266, 2001.

NICOLAS, J.L.; BASUYAX, O.; MAZURIE, J.; THEBAULT, A. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. **Diseases Aquatic Organisms**, v.50, p.35-43, 2002.

NISHIBUCHI, M., KAPER, J.B. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (tdh) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. **Mol Microbiol.** v.4, n.(1), p.87-99, 1990.

NISHIKAWA, Y.; KISHI, T. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. **Epidemiology and Infection**, v.101, p.213-23, 1998.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A.R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **J Appl Microbiol.** v.105, n.(1), p.175-85, 2008.

NORDSTROM, J.L.; VICKERY, M.CL.; BLACKSTONE, G.M.; MURRAY, S.L.; DEPAOLA, A. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters. **Appl Environ Microbiol.** v.73, n.(18), p.5840-5847, 2007.

NUNEZ, Harold; ULLOA, María Teresa; GUERRA, Fabiola y OSORIO, Carlos G. Isla de patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* en cepas chilenas clínicas y ambientales. **Rev. méd. Chile.** v.137, n.(2), p.208-214, 2009.

NWOSU, V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Res Microbiol**, v.152, p.421-430, 2001.

OLIVEIRA, W.K.; WADA, M.Y.; LIMA, J.R.C.; PINHEIRO, A.M.C.; BRITTO, N.P.B.; ARCANJO, S.R. Investigação do surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará. **Bol Eletrôn Epidemiol**, v.4, p.5-7, 2002.

OLIVEIRA, N. J. Antibióticos promotores de crescimento na produção animal. In: 4º Encontro de zootecnista do norte de minas: novas perspectivas mercadológicas, 2008, Montes Claros. **Anais da UFMG**, v.42, p. 89-115, 2008.

OLIVER, D.O.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In: Oliver & Kaper, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T.J. Editors. **Food Microbiology**. Fundamentals and Frontiers American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 228-264, 1997.

OMS, 2001. Estratégias mundiais de la oms para contener la resistència a los antimicrobianos, Geneve, OMS.

ØRMEN, Ø.; GRANUM, P.E.; LASSEN, J.; FIGUEIRAS, M.J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **APMIS**, v.113, p.203-209, 2005.

OTTAVIAN, D.; SANTARELLI, S.; BACCHIOCCHI, S.; MASINI, L.; GHITTINO, C.; BACCHIOCCHI, I. Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. **Food Microbiol.** v.23, n.(5), p.418-22, 2006.

OTWELL, W.S. Ready to eat Seafoods. Important Food Safety Considerations. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ear/FLRTESEA.html>, acesso em 03/09/2007.

PALÚ, P.A.; GOMES, M.L.; MIGUEL, L.M.A.; BALASSIANO, T.I.; QUEIROZ, P.L.M.; FREITAS-ALMEIDA, C.A.; DE OLIVEIRA, S.S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiol.** v.23, p.504–509, 2006.

PANICKER, G.; VICKERY, M.C L.; BEJ, A.K. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. **Can. J. Microbiol.** v.50, p.911–922, 2004.

PANICKER, G.; BEJ, A.K. Real-Time PCR Detection of *Vibrio vulnificus* in Oysters: Comparison of Targeting *vvhA* Oligonucleotide Primers and Probes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, n.(10), p.5702, 2005.

PARK, N.Y.; LEE, J.H.; KIM, M.W.; JEONG, H.G.; LEE, B.C.; KIM, T.S. CHOI, S.H.. Identificatioin of *Vibrio vulnificus wbpP* gene and evaluation of its role in virulence. **Infect. Immun.** v.74, p.721-728, 2006.

PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiol Rev.**v.33, n.(4), p.757-84, 2009.

PATEL, V. J.; GARDNER, E.; Burton, C. S. *Vibrio vulnificus* septicemia and leg ulcer. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.46; p.S144–145, 2002.

PAULY D.; WATSON R. Contando os últimos peixes. Disponível em <<http://www2.uol.com.br/sciam/>>. Acesso em: 09/09/2008.

PAVLOV, D.; WET, C.M.; GRABOW, W.O.; EHLERS, M.M. Potentially pathogenic features of hetero trophic plate count bacteria isolade from treated and untreated drinking water. **International Journal Food microbial.** v.92, n.(3), p.275-87, 2004.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.(4), 2004 (a).

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.(4), p.562-566, 2004 (b).

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos de Estação Experimental de

Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.27 n.(2), p. 387-390, 2007 (a).

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.(1), p.56-59, 2007 (b).

PEREIRA, M.M.D. Avaliação Bacteriológica da Água do Mar e dos Mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guaíba, Baía de Sepetiba, RJ. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008, 80p.

PEREIRA, C.S.; AMORIM, S.D.; SANTOS, A.F.M.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, n.(2), p. 179-182, 2008.

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

PFEFFER, C. S.; HITE, F. M.; OLIVER, J. D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of Eastern North Carolina. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.(6), p.3526-3531, 2003.

PIANETTI, A.; FALCIONI, T.; BRUSCOLINI, F.; SABATINI, L.; SISTI, E.; PAPA, S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n.(12), p.7948-54, 2005.

PIDDOCK, L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev.** v.19, n.(2), p.382-402, 2006.

POLI, C. R., LITTLEPAGE. Desenvolvimento do cultivo de mexilhões no Estado de Santa Catarina. AQUICULTURA BRASIL, Recife, 1998. Anais. Recife, v.1, p.163-181, 1998.

PRUZZO, C.; GALLO, G. & CANESI, L. Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environ. Microbiol**, v.7, n.(6), p.761-772, 2005.

QUENTIN, C.; GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, P. C. Impact of an Urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.(1), p.125-132, 1999.

QUILICI, M.L.; ROBERT-PILLOT, A.; PICART, J.; Fournier, J.M. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. **Emerg Infect Dis.** 11:1148-1149, 2005.

- RAIMONDI, F., J. P.; KAO, C.; FIORENTINI, A.; FABRI, G.; DONELLI, N. GASPARINI, A. FASANO, A. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems. **Infect. Immun.** v.68, p.3180–3185, 2000.
- RALL, V.L.M.; BOMBO, A.J.; LOPES, T.F.; CARVALHO, L.R.; SILVA, M.G. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? **Anaerobe**, v.9, p. 299-303, 2003.
- RENATA, A.C.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. Susceptibilidade "in vitro" a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.45, n.(6), p.458-462, 2008.
- RESGALLA JR., C.R.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. O mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: **Interciência**, v. 324p.324, 2008.
- RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**, 8ª ed., Cap.14, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html> / Acesso em: 06/07/2008).
- RIMAL, A.; FLETCHER, S.M.; MCWATTERS, K.H.; MISRA, S.K.E.; DEODHAR, S. Perception of food safety and changes in food consumption habits: a consumer analysis. **International Journal of Consumer Studies**. p 43-52, 2001.
- RIPABELLE, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M.; FANELLI, I.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Occurrence of *Vibrio* of other pathogenic bacteria in mussels harvested from Adriatic sea. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.43–46, 1999.
- RIPPEY, S.R. Infectious disease associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.419-425, 1994.
- RODRIGUES, P.F. Caracterização sanitária de águas de criação de moluscos bivalves do litoral norte do Estado de São Paulo. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 66p.
- RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.34, n.(5), p.407-411, 2001.
- RODRIGUES, L.K.; MOREIRA, A.M.; ALMEIDA, A.T.S.; RODRIGUES, M.J. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Revista Ciência Rural**, v.34, p.297-299, 2004.
- ROJAS, M.V.R.; MATTÉ, M.H.; DROPA, M.; SILVA, M.L.S.; MATTÉ, G.R. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil, **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.53, n.(4), p.201-205, 2011.

ROLINSON, G.N.; GEDDES, A.M. The 50 th anniversary of the discovery of 6-APA; **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.3-8, 2007.

ROQUE, A.; JOVEN, C.L.; LACUESTA, B.; ELANDALOUSSI, L.; WAGLEY, S.; FURONES, M.D.; ZARZUELA, I.R.; BLAS, I.; RANGDALE,R.; GIL, B.G. Detection and Identification of *tdh*- and *trh*-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Four Species of Cultured Bivalve Molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. **Appl. Environ. Microbiol.** v.75, n.(23), p.7574-7577, 2009.

SACK, D. A.; SACK, R. B.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. Cholera. **Lancet**, v.363, p.223-233, 2004.

SCOGLIO, M.E.; DiPIETRO, A.; PICERNO, F.; DELIA, S.; MAURO, A.; LAGANA, P. Virulence factors in vibrios and aeromonads isolated from seafood. **New Microbiology**, v.24, p.273-80, 2001.

SAKAI, H. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.(12), p.5739-5744, 2004.

SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v.16, p.161-88, 1963.

SANDE, D.; MELO, T.A.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLLI, J.L. Bivalve molluscs prospection in pollution study from Cachoeira and Santana rivers in Ilheus, Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.47, n.(3), p.190-196, 2010.

SAWABE, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; THOMPSON, F.L. Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.(21), 2007.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal Applied Microbiology**, v.97, n.(5), p.1077-86, 2004.

SEPE, A.; BARBIERI, P.; PEDUZZI, R.; DEMARTA, A. Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. **Appl Microbiol**, v.46, p. 439-444, 2008.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002, p. 442-455.

SERRA, C.L.M.; CAVALCANTE, P.R.S.; ALVES, L.M.C.; NASCIMENTO, A.R.; DINIZ, S.C.C.S. Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio Anil (São Luís, Estado do Maranhão). **Acta Scientiarum Biol Sci.** v.25, p.261-3, 2003.

SIGNORINI, S. R. A study of circulation in Bay of Ilha Grande and Bay of Sepetiba. **Bolm. Instituto Oceanográfico, São Paulo**, v. 29, n.(1), p. 41- 55, 1980.

SILVA, N.; NETO, R.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.S.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Campinas: ITAL, 2000. 99p.

SILVA, C.F. Caracterização do canal central da Baía da Ilha Grande com base em sísmica rasa de 7,0 kHz. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geofísica Marinha da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.). Área de Concentração: Geologia e Geofísica Marinha. 2001, 111p.

SILVA, H. A.; SILVA, M.L.; FERREIRA, A. M.; MAGALHÃES, N.; ALBUQUERQUE, M. M., 2001. **Methodology evaluation for detection of *Salmonella* in bivalve molluscs from highly contaminated waters**. 31st WEFTA meeting. May, p. 21- 31, 2001. Espoo, Finland.

SILVA, A. I. M. Bacteria of fecal origin, in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó River estuary, Ceará State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.(1-2), p.126-130, 2004.

SIMON, M; SILVA, F. C. Custo de produção da ostra nativa cultivada no município de Guaratuba-PR. Florianópolis: **Fixarte**, p.20, 2006.

SMITH, P. R.; BRETON, A. L., HOSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide antimicrobial use in animals**. Oxford, Blackwell Publishing, v.5, p.206-217, 2008.

SODRÉ, F.N.G. dos S. Avaliação da qualidade ambiental e crescimento do mexilhão *Perna perna* no parque de cultivo de moluscos bivalves de Guaibura, Guarapari. Guarapari, Universidade Federal do Espírito Santo, **Monografia de Especialização em Ecologia e Recursos Naturais**, 2001, 50p.

SOLOMON, H.M.; LILLY, T. *Clostridium botulinum*. In: Bacteriological Analytical Manual, 8^a ed., Cap. 17, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html> / Acesso em: 06/07/2008).

SOTOMAYOR, M. A.; BALCÁZAR, J. L. Inibição de vibrios patogênicos de camarão por mezclas de cepas probióticas. **Revista Aquatic**, n.19, p.9-15, 2003.

SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.F.; MENEZES, F.G.R.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.46, n.(2), p.59-62, 2004.

SOUZA, R.C.C.L. Bivalves marinhos introduzidos no Brasil. Resumos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Resumos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, 2003.

SRINIVASAN, V.B.; VIRK, R.K.; KAUNDAL, A.; CHAKRABORTY, R.; DATTA, B.; RAMAMURTHY, T.; MUKHOPADHVAY, A.K.; GOSH, A. Mechanism of drug resistance in clonally related clinical isolates of *Vibrio fluvialis* isolated in Kolkata, India. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, n.(7), p.2428-32, 2006.

STROM, M.S.; PARANJPYE, R.N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes and Infection.** v.2, p.177-188, 2000.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiol.** v.24, p.549-58, 2007.

SZCZUKA, E.; KAZNOWSKI, A. Typing of Clinical and environmental *Aeromonas sp.* Strains by Random amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology,** v.42, p.220-228, 2004.

TAMPLIN, M.L. Coastal vibrios: identifying relationships between environmental condition and human disease. **Human and Ecological Risk Assessment,** v.7, p.1437-1445, 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution,** 28, p.2731-2739., 2011.

TANG, W.M.; WONG, J. Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. **Orthopedics,** v.22, p.443-444, 1999.

TARR, C.L.; PATEL, J.S.; PUHR, N.D.; SOWERS, E.G.; BOPP, C.A.; STROCKBINE, N.A. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. **J Clin Microbiol** v.45, p.134-140, 2007.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology,** v.78, p.31-41, 2002.

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

TERAI, A.; BABA, K.; SHIRAI, H.; YOSHIDA, O.; TAKEDA, Y.; NISHIBUCHI, M. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. **J Bacteriol,** v.173, p.5036-5046, 1991.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.68, p.403-431, 2004.

THOMPSON FL, GEVERS D, THOMPSON CC, DAWYNDT P, NASER S, HOSTE B, MUNN CB, SWINGS J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl Environ Microbiol.** v.71, p.5107-5115, 2005.

TOLEDO LM. O cólera nas Américas e sua produção no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. II, n.(1), p. 08-38, 1993.

VARGHESE, M.R.; FAR, R.W.; WAX, M.K.; CHAJIN, B.J.; OWENA, R.M. *Vibrio fluvialis* wound infection associated with medicinal teech therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.709-10, 1996.

VASCONCELOS, R.H. Balneabilidade das praias de Iracema e Náutico (Fortaleza – Ceará) e pesquisa de cepas de *Escherichia coli* patogênicas em suas águas. 2005. Monografia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005, 31p.

VELUSAMY, S.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M.J.; NQUYEN, L.T.; SCHUKKEN, Y.H.; OLIVER, S.P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* from dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n.(3-4), p. 319-328, 2007.

VENIERI, D.; VANTARAKIS, A.; KOMNINO, G.; PAPAPETROPOULOU, M. Microbiological evaluation of bottled non- carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. **International Journal food Microbiology**, v.107, n.(1), p. 68-72, 2006.

VIEIRA, R. H. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M. & CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.33, p.107-112, 2000.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004. 380 p.

VIEIRA, R. H. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M. & CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 33, p. 107-112, 2004.

VIEIRA, R.H.S.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A.D. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.45, n.(3), p.180-189, 2008.

VIEIRA, R.H.S.F. et al. Raw oysters can be a risk for infections. **Brazilian Journal Infect Disease**. v.14, n.(1), p. 66-70, 2010.

VILA, J.; MARCO, F.; SOLER, L.; CHACON, M.; FIGUERAS, M.J. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.701–702, 2002.

VILLARI, P.; CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; BOCCIA, S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral Waters. **Applied Environmental Microbiology** v.69, n.(1), p. 697-701, 2003.

VINATEA, L. A. A. Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros: estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Tese de Doutorado Interdisciplinar em Ciências Humanas**, 2000, 245p.

VITELA, M.R.T.; ESCARTIN, E.F. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in raw fish, oysters and shrimps. **Rev. Lat. Microb.**, v.35, n.(3), p.267-72, 1993.

VOLLBERG, C.M.; Herrera, J.L. *Vibrio vulnificus* infection: an important cause of septicemia in patients with cirrhosis. **South. Med. J.** v.90, p.1040-1042, 1997.

XIE, Z-Y; HU, C-Q.; CHEN, C.; ZHANG, L. P.; REN, C. H. Investigation of seven *Vibrio virulence* genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 41, n.(2), p. 202-207, 2005.

WANG, J.; SASAKI, T.; MAEHARA, Y.; NAKAO, H.; TSUCHIVA, T.; MIYOSHI, S. Variation of extracellular proteases produced by *Vibrio vulnificus* clinical isolates: Genetic diversity of the metalloprotease gene (*vvp*), and serine protease secretion by *vvp*-negative strains. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.(6), p. 494–500, 2008., 2008.

WEBER, B.; CHEN, C.; MILTON, D.L. Colonization of fish skin is vital for *Vibrio anguillarum* to cause disease. **Environmental Microbiology Reports**, v.2; n.(1); p.133-139. 2010.

WEBSTER, L.F.; THOMPSON, B.C.; FULTON, M.H.; CHESTNUT, D.E.; VANDOLAH, R.F.; LEIGHT, A.K. Identification of sources of *Escherichia coli* in Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. **J Exp Mar Biol Ecol.** v.298, p.179–195, 2004.

WEST, P.A. The human pathogenic vibrios- A public health update with environmental perspectives. **Epidem. Infec.**, v.103, n.(1), p.1-34, 1989.

World Health Organization (WHO). Cholera.Update, end of 1993. **Weekly Epidemiological Record**; v.69, n.(3), p.13-17, 1994.

World Health Organization (WHO). Communicable disease Surveillance and Response (CSR). Cholera: Basic facts for travelers. Disponível em: <http://www.who.int/emc/disease/cholera/factstravellers.html>. Acesso em: 10.01.2007.

World Health Organization (WHO). Cholera.Update, end of 1993. **Weekly Epidemiological Record**, v.69, n.3, p.13-17, 1994.

World Health Organization (WHO).Cholera. The Epidemic in Peru – part II. **Weekly Epidemiological Record**, v.66, n.10, p.65-70, 1997.

World Health Organization (WHO), “Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters”, Microbiological Risk Assessment Series, Chapter 8, 2005.

YANO, Y.; YOKOYAMA, M.; SATOMI, M.; OIKAWA, H. & CHEN, S-S. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in china. **Journal of Food Protection**, v.67, n.(8), p.1617-1623, 2004.

YEUNG, P. S.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio* infections. **Foodborne Pathog.Dis.**, v.1, n.(2), p.74-88, 2004.

YII, K.C.; YANG, T.I.; LEE, K.K. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers *Epinephelus coiides*. **Current Microbiology**, v.35, p.109-15, 1997.

ZAMARIOLI, L. A.. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata* recém coletados nos bancos naturais do litoral da baixada santista. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1997. Relatório Apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX.

ZANETTI, S.; SPANU, T.; DERIU, A.; ROMANO, L.; SECHI, L.A.; FADDA G. *In vitro* susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. **International Journal Antimicrobial Agents**. v.17, p.407-409, 2001.