

VEICULAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS EM FRUTOS DO MAR

Norma Suely EVANGELISTA-BARRETO*; Adriana Pereira SAMPAIO; Rebeca Ayala Rosa da SILVA; Margarete Alice Fontes SARAIVA e Irana Paim SILVA

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

*email: nsevangelista@yahoo.com.br

Recebido em 14/04/2017

Resumo - O consumo de frutos do mar tem sido responsável por inúmeros casos de toxinfecções alimentares em humanos. Dentre os micro-organismos mais implicados nesses surtos se destacam *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.. O presente trabalho teve como objetivo identificar cepas suspeitas de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de amostras de sururu (*Mytella guyanensis*) in natura e siri (*Callinectes* spp.) processado, bem como verificar a resistência antimicrobiana frente a antimicrobianos comerciais. De um total de 50 cepas suspeitas de *E. coli* (25) e *Salmonella* spp. (25), nove foram confirmadas como *Salmonella* (sururu) e 17 como *E. coli* (12 sururu e 05 siri processado). Resistência antimicrobiana foi observada para a vancomicina (100%) em ambos os micro-organismos. *Salmonella* spp. se mostrou resistente à cefalotina e à tetraciclina (88,8%) e *E. coli* a tetraciclina (29,4%), ampicilina e sulfametoxazol-trimetropin (23,5%). Perfil de multiresistência foi observado em todas as cepas de *Salmonella* e para *E. coli* apenas nas isoladas de sururu. Genes de resistência móveis foram observados em 77,7% das cepas de *Salmonella* e 17,6% das cepas de *E. coli*. A presença de enterobactérias patogênicas multiresistentes em mariscos representa um risco à saúde dos consumidores, uma vez que podem causar infecções de difícil tratamento ou mediar resistência para a microbiota indígena do trato gastrointestinal do homem.

Palavras-Chave: Mariscos, *Salmonella*, Multiresistência, *Mytella guyanensis*

TRANSMISSION OF ANTIMICROBIAL RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE IN SEAFOOD

Abstract - The consumption of seafood has been responsible for numerous cases of food poisoning in humans. Among the microorganisms most involved in these outbreaks are *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.. This study aimed to identify suspicious strains of *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from samples of mussels sururu (*Mytella guyanensis*) in natura and processed crab (*Callinectes* spp.), as well as check the antimicrobial resistance to commercial antimicrobials. From a total of 50 suspected strains of *E. coli* (25) and *Salmonella* spp. (25), nine were confirmed as *Salmonella* (in sururu) and 17 as *E. coli* (12 in sururu and 05 in processed crab). Antimicrobial resistance to vancomycin was observed in all (100%) both microorganisms. *Salmonella* spp. was resistant to cephalothin and tetracycline (88.8%) and *E. coli* to tetracycline (29.4%), trimethoprim-sulfamethoxazole and ampicillin (23.5%). Multiresistant profile was observed in all strains of *Salmonella* and to *E. coli* only in isolated mussels. A mobile resistance gene was observed in 77.7% of the *Salmonella* strains and 17.6% of strains of *E. coli*. The presence of multi-drug resistant pathogenic enterobacteriaceae in shellfish poses a risk to consumer health, since they can cause infections difficult to treat or mediate resistance to the indigenous microflora of the digestive tract of man.

Keywords: Seafood, *Salmonella*, Multiresistance, *Mytella guyanensis*

Trabalho financiado por: PPSUS (Edital 004/2009).

INTRODUÇÃO

Moluscos bivalves e crustáceos são encontrados praticamente em todo o litoral brasileiro, sendo muito utilizados na composição de diversos pratos típicos da culinária regional. Os mariscos apresentam elevado valor nutricional, porém são perecíveis e podem albergar agentes etiológicos transmissíveis de doenças, relacionados à manipulação, ao processamento e à conservação inadequada, além da captura em ambientes contaminados (CAMILO, FREITAS, NEIVA, COSTA & SILVA, 2016).

A identificação rápida e precisa desses agentes etiológicos, tanto para a garantia da qualidade quanto para traçar um perfil dos patógenos bacterianos é muito importante dentro do abastecimento de alimentos (RAUFU et al., 2014). Em virtude disso, micro-organismos indicadores vêm sendo utilizados na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos, fornecendo informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, presença de bactérias patogênicas ou de deterioração, além de indicarem condições sanitárias inadequadas durante o processamento, a produção ou o armazenamento (EVANGELISTA-BARRETO, PEREIRA, SILVA & FERREIRA, 2013).

Escherichia coli e *Salmonella* spp. são os micro-organismos mais utilizados como indicadores de qualidade e, frequentemente, relacionados às doenças veiculadas por alimentos (FARDSANEI et al., 2016; TAYH et al., 2016). Além disso, estes micro-organismos têm sido relatados em casos de resistência antimicrobiana, comprometendo o tratamento em doenças infecciosas (GONÇALVES et al., 2016).

O uso abusivo de fármacos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, tem contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana. Entretanto, esta também pode estar associada à produção de enzimas (Metallo- β -lactamases e β -lactamases de amplo espectro), que atuam sobre a estrutura de alguns compostos, inativando-os, característica que constitui um mecanismo de ação dos micro-organismos (TAYH et al., 2016). Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* previamente isoladas de amostras de sururu in natura e siri processado, bem como verificar a resistência antimicrobiana aos fármacos comerciais e determinar a origem da resistência se plasmidial ou cromossômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas suspeitas de *E. coli* (09 de siri processado (*Callinectes* spp.) e 16 de sururu in natura (*Mytella guyanensis*)) e *Salmonella* spp. (10 cepas de siri processado e 15 de sururu in natura), depositadas no acervo de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do

Recôncavo da Bahia, UFRB. As cepas se encontravam em agar estoque, armazenadas a 5°C.

IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP.

Os isolados suspeitos foram ativados em caldo nutriente e incubados a 37°C/ 24 h. Após esse período, alíquotas foram semeadas em agar *Salmonella-Shigella* (SS) e incubadas a 37°C/ 24 h. Decorrido esse período, colônias típicas (incolores com ou sem o centro negro) foram transferidas para tubos contendo agar Tripton de Soja (TSA) inclinado e incubados a 37°C/ 24 h. Após este período, as cepas foram submetidas aos testes bioquímicos: agar Tríplice Açúcar Ferro, agar Lisina Ferro, agar Citrato de Simmons, Indol, Uréia e Malonato e, posteriormente, ao teste sorológico com soro polivalente somático (antígenos O e Vi) (SILVA et al., 2010).

IDENTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*

Uma alçada das culturas mantidas em agar TSA foi transferida para o caldo nutriente e incubados a 37°C/ 24 h. Após esse período, uma alíquota foi semeada em agar Eosina Azul de Metileno e incubadas a 37°C/ 24 h. As colônias típicas de *E. coli* (centro negro, com ou sem brilho metálico) foram transferidas para tubos contendo agar TSA e incubados a 37°C/ 24 h. Na sequência, os isolados foram submetidos ao teste de IMViC: Indol, VM (Vermelho de Metila), VP (Voges-Proskauer) e agar Citrato de Simmons (SILVA et al., 2010).

TESTES DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco, seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), utilizando discos contendo antibióticos disponíveis comercialmente: ácido nalidixico (30 µg), ampicilina (10 µg), amicacina (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina, cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), sulfamethoxazole + trimetoprim (25 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

ÍNDICE DE RESISTÊNCIA (ARI)

O índice de resistência aos antimicrobianos (ARI) foi calculado, por meio da fórmula:

$$ARI = y / (n \cdot x),$$

Em que y corresponde ao total do número de cepas resistentes; n o número de isolados e x o número de antimicrobianos testados (CHITANAND, KADAM, GYANANATH, TOTEWAD & BALHAL, 2010).

MÚLTIPLA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (MAR)

O índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana (MAR) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Índice MAR} = a/b,$$

Em que o número de antimicrobianos, ao qual o isolado foi resistente (a) dividido pelo número de antimicrobianos, ao qual o isolado foi exposto (b) (KRUMPERMAN, 1983).

CURA PLASMIDIAL

A presença ou ausência de plasmídios-R foi testada para as cepas, que apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos testados, conforme descrito por Molina-Aja et al. (2002). A partir do crescimento bacteriano, em meio agar TSA, foi transferido um alçada da cultura para o caldo Luria Bertani (LB) suplementado com Laranja de acridina na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubados por $37^\circ\text{C}/24 \text{ h}$. As culturas crescidas no caldo LB foram submetidas novamente ao teste de antibiograma frente aos antimicrobianos, aos quais haviam apresentado resistência anteriormente para determinação de alteração no perfil de resistência.

EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

A extração do plasmídeo foi realizada nos isolados, que apresentaram perfil de resistência a pelo menos um antimicrobiano, bem como nos isolados submetidos ao processo de cura plasmidial. De culturas crescidas em TSA, foi transferida uma alçada para tubos, contendo 5 mL de meio BHI. Os tubos foram incubados a $37^\circ\text{C}/24 \text{ h}$. Após esse período foi realizada a extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I com modificações. A visualização do DNA plasmidial foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo. O mercador de peso molecular usado foi de 1 kb DNA ladder.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

Do total de 16 cepas estudadas, *Salmonella* spp. foi confirmada em 36% (09) dos isolados provenientes das amostras de sururu in natura. Os moluscos bivalves apresentam como principal características seu caráter filtrador, que contribui para o acúmulo de densidades consideráveis de micro-organismos, além do seu habitat natural, o sedimento lamoso.

Nos isolados provenientes das amostras de siri processado não foi confirmado *Salmonella*

spp., podendo ser atribuído ao tratamento térmico, ao qual o crustáceo é submetido para retirada da carapaça juntamente com o resfriamento aplicado as amostras durante o transporte e comercialização.

A Resolução RDC nº 12 de 2001, para moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, determina que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g do produto (BRASIL, 2001). Desta forma, a presença de *Salmonella* nas amostras de sururu indica a inadequação do produto para o consumo, constituindo um sério problema para a saúde dos consumidores, visto a patogenicidade deste micro-organismo.

A presença de *Salmonella* também foi relatada em supermercados varejistas de Xangai, China, ao avaliarem 730 amostras de pescados e outros alimentos e observarem que 29,7% (217) das amostras continham a bactéria, sendo 27,2% (59) em amostras de moluscos; 6,0% (13) em mariscos; 4,6% (10) em camarão e 6,5% (14) de amostras variadas (ZHANG et al., 2015). De acordo com os autores, os produtos alimentares de origem aquática, contendo patógenos podem representar um risco à saúde e servir de reservatórios para cepas de *Salmonella* spp. portando genes de resistência.

Escherichia coli foi confirmada em 29,4% (05) dos isoladas de siri processado (n=9) e em 70,5% (12) dos isolados de sururu in natura (n=16). A presença de bactérias do grupo coliforme a 45°C em alimentos, principalmente, em frutos do mar indica contaminação de origem fecal nas áreas de coleta ou condições higiênicas sanitárias insatisfatórias, uma vez que a população microbiana desse grupo é constituída, principalmente, de estirpes de *E. coli* (SILVA et al., 2010).

Em Maragogipe, Baía do Iguape, Bahia, área de origem dos isolados, a falta de saneamento básico em algumas regiões do município contribui para a elevada contaminação de origem fecal, por efluentes domésticos e o descarte indevido de resíduos orgânicos que ocorre nas margens dos manguezais. Além disso, a falta de conhecimento por parte dos manipuladores/marisqueiras ou mudanças de hábito no que tange a higienização de utensílios e equipamentos, durante o processamento artesanal da carne de sururu e siri, compromete a inocuidade dos mariscos, levando a comercialização de alimentos com baixa qualidade microbiológica.

Realidade semelhante foi relatada por Nascimento et al. (2011) ao observarem a presença de *E. coli* e *Salmonella* em moluscos bivalves comercializados no mercado central da cidade de Aracaju, Maceió. Segundo os autores, o tratamento térmico usado durante o desconchamento dos moluscos não tem sido satisfatório para garantir a inocuidade do alimento, em virtude da contaminação pós-processamento.

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* SPP.

Nove cepas de *Salmonella* spp. apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos testados. O aumento de bactérias resistentes em áreas ambientais tem sido atribuído à contaminação da água, pelo lançamento de resíduos de antimicrobianos oriundos de efluentes domésticos e/ou a presença de cultivos de animais. Este fenômeno tem favorecido a instalação, a manutenção e a propagação de características de resistência entre as populações bacterianas no ambiente aquático (VIVANT et al., 2016).

Salmonella spp. apresentou 100% de resistência à vancomicina, seguido dos antimicrobianos cefalotina e tetraciclina (88,8%), ampicilina e sulfametoxazol (77,7%) e ácido nalidíxico (33,3%) (Figura1).

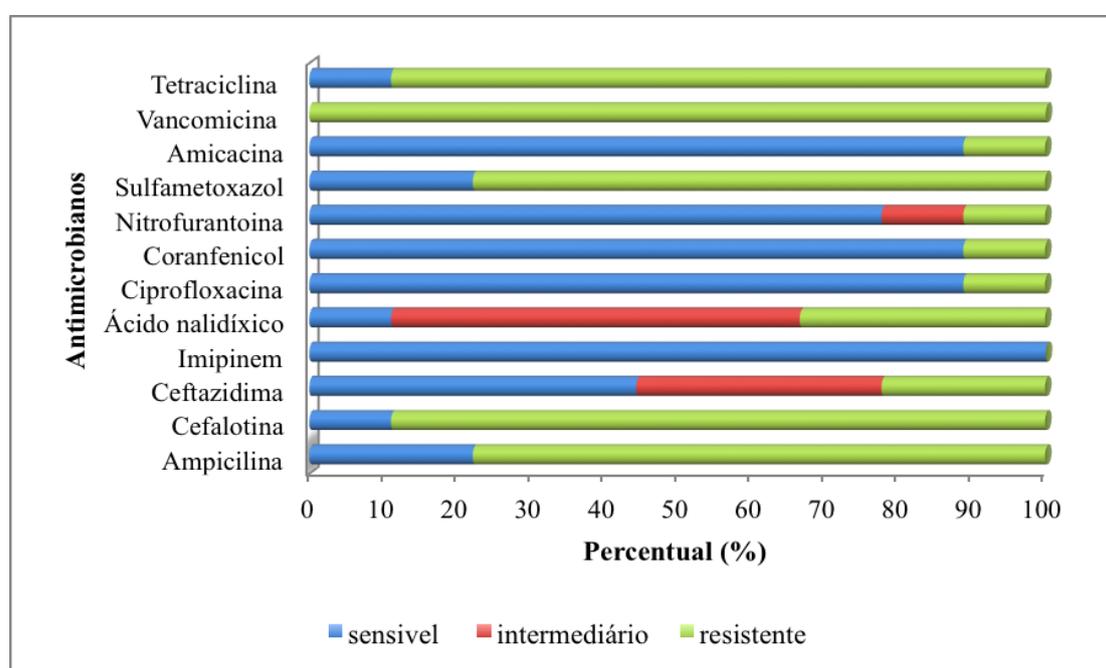


Figura 1. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. para os diferentes antimicrobianos testados.

Dos 12 antimicrobianos testados, somente em 04 (33,3%), amicacina (aminoglicosídeo), cloranfenicol (cloranfenicol), ciproflaxina (quinolona) e imipinem (betalactâmico) a bactéria apresentou sensibilidade acima de 80%. Este fato é preocupante, por se tratarem de cepas resistentes veiculadas em alimentos para o homem, principalmente, aos antimicrobianos do grupo β -lactâmico, classe amplamente utilizada no controle de doenças infecciosas (MANJUSHA & SARITA, 2013).

Segundo Zhang et al. (2015), nos últimos anos, a maioria das infecções ocasionadas por *Salmonella* multirresistentes tem ocorrido devido a ingestão de alimentos de origem animal contaminados. Elevada resistência à vancomicina tem sido atribuída a presença de uma membrana

externa nas bactérias Gram negativas, que dificulta a passagem de moléculas grandes, limitando o seu acesso ao sítio-alvo (ARAÚJO, ALVES & BECHTLUFFT, 2009).

Resistência aos antimicrobianos: ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim e ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de peixe, de camarão, de lagosta e de caranguejo também foi relatada no Irã, tratando-se do primeiro relato desse micro-organismo, a partir de pescado no país (RAHIMI, SHAKERIAN & FALAVARJANI, 2013).

O índice de resistência aos antimicrobianos (ARI) observado para *Salmonella* variou de 0,01 a 0,07, demonstrando elevado risco de disseminação de genes de resistência (Tabela 1). Para o perfil de multirresistência, todas as cepas apresentaram índice MAR, variando de 0,17 a 0,67, ou seja, resistência de dois a oito antimicrobianos (Tabela 1). Acredita-se que parte da resistência múltipla observada se deve a presença de genes móveis nas cepas de *Salmonella* (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de resistência aos antimicrobianos (ARI), índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e resistência plasmidial das cepas de *Salmonella* isoladas de sururu e siri processado.

| Cepas | Antimicrobianos | ARI | MAR | Resistência plasmidial |
|-------|--|------|------|------------------------|
| 1 | AMP, NAL, CFL, SUT, TET, VAN | 0,05 | 0,50 | NAL, SUT |
| 2 | TET, VAN | 0,01 | 0,17 | - |
| 3 | AMP, CFL, SUT, TET, VAN | 0,04 | 0,42 | SUT |
| 4 | AMP, NAL, CFL, SUT, TET, VAN | 0,05 | 0,50 | NAL, SUT |
| 5 | AMP, CFL, SUT, TET, VAN, CAZ | 0,05 | 0,50 | CFL, SUT, CAZ |
| 6 | AMP, NAL, CFL, SUT, TET, VAN, CAZ | 0,06 | 0,58 | CAZ, SUT |
| 7 | AMP, CFL, CIP, CLO, NIT, SUT, TET, VAN | 0,07 | 0,67 | CIP, CLO, NIT |
| 8 | AMP, CFL, SUT, TET, VAN | 0,04 | 0,42 | - |
| 9 | CFL, VAN | 0,01 | 0,17 | - |

ARI: Índice de resistência a antimicrobianos; MAR: Múltipla Resistência Antimicrobiana. VAN - vancomicina, CFL - cefalotina, TET - tetraciclina, AMP - ampicilina, SUT - sulfametoxazol-trimetropin, NAL - ácido nalidíxico, CAZ - ceftazidima, NIT - nitrofurantoína, CIP - ciprofloxacina, CLO - cloranfenicol.

Veiculação de *Salmonella* multirresistentes em frutos do mar também foi relatada por Kumar, Surendran & Thampuran (2010) ao detectarem estirpes de *Salmonella* spp. resistentes até quatro fármacos. Na China, sorovares de *Salmonella* em frutos do mar resistentes as várias classes de antimicrobianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, nitrofuranos, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas), apresentando elevado padrão de multirresistência (até 10 antimicrobianos) foi observado por Yan et al. (2010).

As cepas de *Salmonella* spp. resistentes a, pelo menos, um dos antimicrobianos testados e submetidas à cura plasmidial, ácido nalidíxico (3) e sulfametoxazol-trimetropin (7), apresentaram resistência mediada por plasmídeos, assim como as cepas resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, cloranfenicol e nitrofurantoína (Tabela 1).

Resistência mediada por plasmídeos também foi encontrada por Fardsanei et al. (2016) ao analisarem cepas de *Salmonella* isoladas de diferentes fontes humanas e alimentares e encontrarem mais de sete perfis diferentes de plasmídeos, sendo dois deles comuns entre os isolados clínicos e alimentares. Em áreas ambientais poluídas por antimicrobianos, a transferência horizontal de plasmídeos conjugativos em bactérias tem ocorrido como uma resposta ao estresse ambiental e, por isso, exercem papel essencial no acúmulo de bactérias resistentes (DANG, MAO, XU & LUO, 2017).

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI*

O perfil de suscetibilidade das estirpes de *E. coli* (n=17) para os diferentes antimicrobianos testados apresentou um comportamento bem diferente do observado para as cepas de *Salmonella* spp. (Figura 2). Dos 12 antimicrobianos testados, a eficiência de inibição variando de 80 a 100% foi observada para 58,3% (7) dos fármacos.

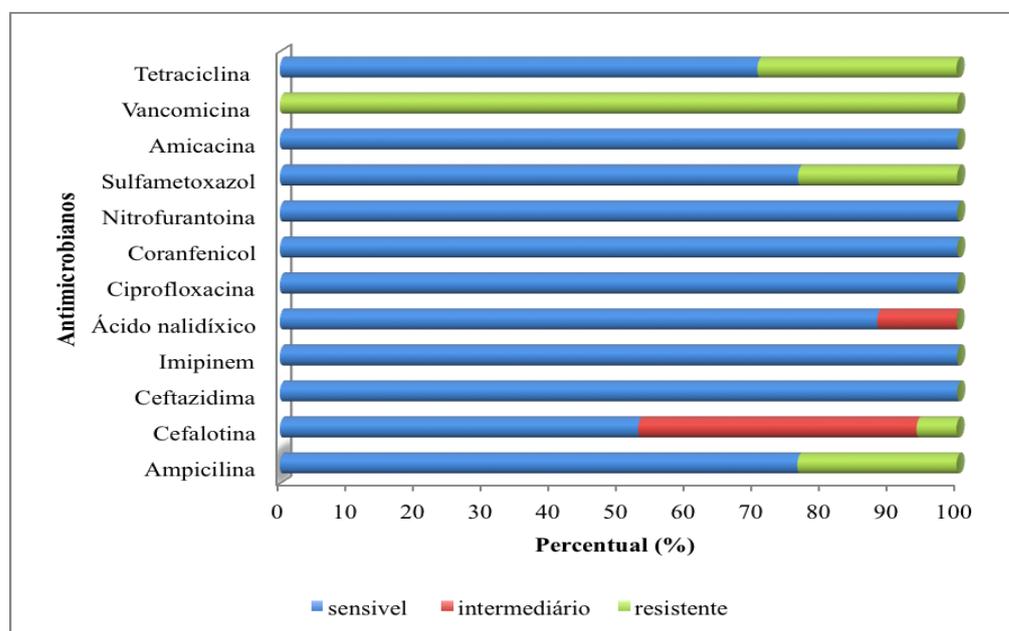


Figura 2. Suscetibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* para os diferentes antimicrobianos testados.

Resultados semelhantes foram citados por Jeyasanta, Aiyamperumal & Patterson (2012) ao analisarem frutos do mar de Tuticorin, Sudeste da Índia e relatarem cepas de *E. coli* com perfil de

suscetibilidade a amicacina, ao cloranfenicol e a ciprofloxacina.

A suscetibilidade das cepas de *E. coli* aos betalactâmicos (cefalotina e ampicilina) acima de 50% também é satisfatória, uma vez que estes fármacos podem ser a escolha no tratamento de infecções, principalmente urinárias, em que *E. coli* tem sido o agente causador mais implicado (GOMES & MAHLKER, 2013).

Com relação ao perfil de multirresistência, seis cepas apresentaram índice MAR variando de 0,17 a 0,33, ou seja, resistência de dois a quatro antimicrobianos, bem inferior ao observado para *Salmonella*. O índice MAR das cepas de *E. coli* também foi inferior ao encontrado para *Salmonella* (Tabela 1), o que demonstra o risco biológico de surtos envolvendo estes alimentos e *Salmonella*, patógeno em potencial e com elevada resistência antimicrobiana. Para o índice de resistência aos antimicrobianos (ARI) os valores observados foram de 0,004 a 0,019 (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de resistência aos antimicrobianos (ARI), índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) e resistência plasmidial de cepas de *Escherichia coli* isoladas de sururu e siri processado.

| Cepa | Antimicrobianos | ARI | MAR | Resistência Plasmidial |
|------|--------------------|-------|------|------------------------|
| 1 | AMP, SUT, VAN | 0,014 | 0,25 | - |
| 2 | VAN | 0,004 | - | - |
| 3 | AMP, SUT, TET, VAN | 0,019 | 0,33 | SUT |
| 4 | VAN | 0,004 | - | - |
| 5 | VAN | 0,004 | - | - |
| 6 | VAN | 0,004 | - | - |
| 7 | VAN | 0,004 | - | - |
| 8 | VAN | 0,004 | - | - |
| 9 | CFL, VAN, TET | 0,014 | 0,25 | CFL |
| 10 | VAN | 0,004 | - | - |
| 11 | VAN | 0,004 | - | - |
| 12 | VAN | 0,004 | - | - |
| 13 | VAN | 0,004 | - | - |
| 14 | SUT, TET, AMP, VAN | 0,019 | 0,33 | - |
| 15 | TET, VAN | 0,009 | 0,17 | - |
| 16 | VAN | 0,004 | - | - |
| 17 | SUT, AMP, TET, VAN | 0,019 | 0,33 | - |

ARI: Índice de resistência a antimicrobianos; MAR: Múltipla Resistência Antimicrobiana; VAN - vancomicina, CFL - cefalotina, TET - tetraciclina, AMP - ampicilina, SUT - sulfametoxazol-trimetropin.

Cepas de *Escherichia coli* com índice MAR superior (até cinco antimicrobianos) ao encontrado no presente trabalho foram relatadas por Evangelista-Barreto, Moura, Teixeira, Assim & Miranda (2012). Segundo os autores, o perfil de multirresistência em cepas de *Escherichia coli* demonstra que o ambiente de captura sofre com o lançamento de resíduos antimicrobianos.

Em relação ao perfil de resistência, mediado por genes cromossomais ou plasmidiais, observou-se que apenas duas cepas, uma para o sulfametoxazol-trimetropin e outra para a cefalotina apresentaram resistência mediada por plasmídeos (Tabela 2).

Cepas bacterianas com perfil de resistência plasmidial agravam a problemática da resistência microbiana devido a facilidade de disseminação entre os micro-organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes (NASCIMENTO & ARAÚJO, 2014) aumentando o número de bactérias multirresistentes em um determinado ambiente (MANJUSHA & SARITA, 2013).

EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Os resultados obtidos com a extração plasmidial demonstraram que o processo de cura plasmidial não foi eficiente na eliminação de todos os elementos móveis. Das nove cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos, 07 (77,7%) apresentaram plasmídeo (Figura 3a). Além disso, verificou-se que estes isolados, após terem sido submetidos ao processo de cura, continuaram portando o elemento extracromossômico (Figura 3b), sugerindo que a bactéria apresenta mais de um plasmídeo na célula.

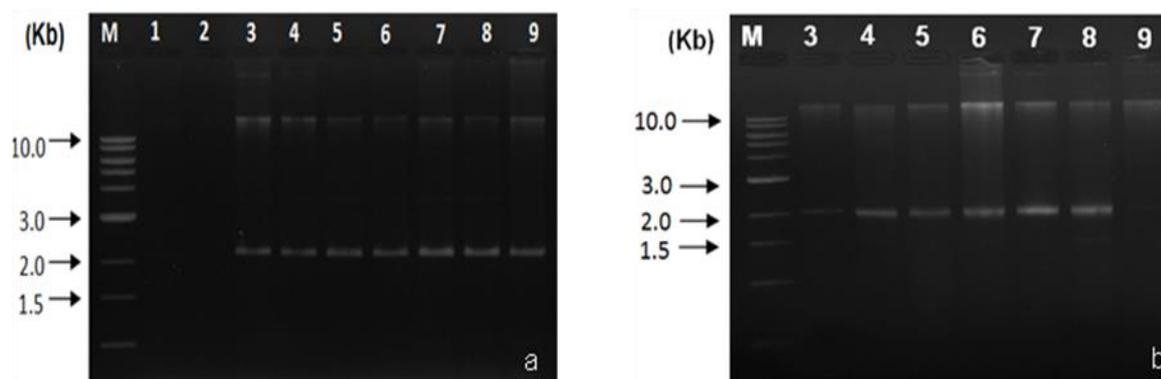


Figura 3. (a) DNA plasmidial de isolados (1-9) de *Salmonella* spp. (b) DNA plasmidial de isolados (3-9) de *Salmonella* spp. após a cura plasmidial. M (Marcador molecular 1 kb Ladder).

Gohar et al. (2015) estudando a presença de plasmídeos em cepas resistentes de *E. coli* relataram isolados, contendo de um até cinco plasmídeos presentes nos isolados. Para Manjusha & Sarita (2013), os elementos genéticos móveis em bactérias têm sido um dos principais meios de

difusão da resistência microbiana, uma vez que a transferência de genes de resistência entre as bactérias ocorre por conjugação.

Para as cepas de *E. coli*, das 17 cepas com perfil de resistência, 03 (isolados 7, 14 e 16) apresentaram plasmídeo, indicando resistência mediada por plasmídeo, porém quando submetidos ao processo de cura, os mesmos não foram perdidos (Figura 4a - b), demonstrando que a concentração do agente de cura usado deve ser maior. Para Gohar et al. (2015), a pequena variação na eficiência do processo de cura é dependente da permeabilidade através da membrana externa e a localização dos genes responsáveis pela resistência.

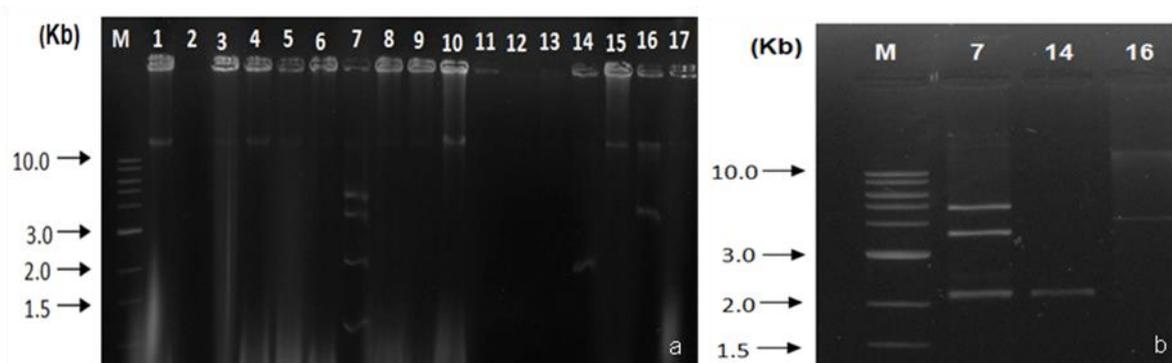


Figura 4. (a) Gel de DNA plasmidial dos isolados 7, 14 e 16 de *E. coli* antes da cura. (b) Gel de DNA plasmidial dos isolados 7, 14 e 16 de *E. coli* após o processo de cura. M (Marcador molecular de 1 kb Ladder).

Resistência em isolados de *E. coli* mediada por plasmídeos também foi relatada por Araújo, Alves & Bechtluft (2009), em amostras de águas, do Ribeirão Paciência em Minas Gerais. Segundo os autores, o rio recebe efluentes de várias fontes (doméstico, abatedouros, hospitalar e criatórios de aves e suínos) e a presença de alguns plasmídeos pode estar relacionada à sobrevivência dos micro-organismos neste ambiente.

Devido a grande distribuição ambiental de *E. coli* e sua veiculação, em frutos do mar, faz-se necessário o monitoramento contínuo de bactérias multirresistentes, de modo a identificar a fonte e o mecanismo de resistência. Para Brahmi, Dunyach-Remy, Touati, & Lavigne (2015), o grande problema da resistência a um agente antimicrobiano é que este, frequentemente, resulta em resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos da mesma classe, aumentando a multiresistência do micro-organismo.

CONCLUSÕES

As cepas de *Salmonella* e *Escherichia coli* veiculadas em frutos do mar como sururu e siri apresentam elevado perfil de multiresistência, representando um risco à saúde dos consumidores, uma vez que podem causar infecções de difícil tratamento, como também transferir genes de resistência para outras bactérias presentes no organismo, elevando o risco de proliferação de microorganismos com resistência a um número cada vez maior de fármacos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.G., ALVES, E.M.G. & BECHTLUFFT, M.P. (2009). Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a antibióticos isoladas do Ribeirão Paciência - Pará de Minas - MG. *Synthesis*, 1(1): 282-292.

BRAHMI, S., DUNYACH-REMY, C., TOUATI, A. & LAVIGNE, J.-P. (2015). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21(1): 18-20.

Brasil (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder executivo. Brasília, DF, p.1-48, 02 de jan. 2001.

CAMILO, V.M.A., FREITAS, F., NEIVA, G.S., COSTA, T.S. & SILVA, I.M.M. (2016). Processamento artesanal de sururu (*Mytella guyanensis*) pelas marisqueiras da RESEX Baía do Iguape: avaliação da qualidade antes e após intervenção educativa. *Vigil. Sanit. Debate*, 4(4): 34-42.

CHITANAND, M.P., KADAM, T.A., GYANANATH, G., TOTEWAD, N.D. & BALHAL, D.K. (2010). Multiple antibiotic resistance indexing of coliforms to identify high risk contamination sites in aquatic environment. *Indian J. Microbiol.*, 50(1): 216-220.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement, 2(7): 1-24.

DANG, B., MAO, D., XU, Y. & LUO, Y. (2017). Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. *Water Res.*, 111(1): 81-91.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S., MOURA, F.C.M., TEIXEIRA, J.A., ASSIM, D.A. & MIRANDA, P.C. (2012). Avaliação das condições higiênico - sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas. *Rev. Caatinga*, 25(3): 86-95.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S., PEREIRA, A.F., SILVA, R.A.R. & FERREIRA, L.T.B. (2013). Carne de siri como veículo na disseminação de enteropatógenos resistentes aos

antimicrobianos. *Actapesca*, 1(1): 45-56.

FARDSANEI, F., NIKKHAHI, F., BAKHSHI, B., ZAHRAEI SALEHI, T., ASRAFI TAMAI, I. & SOLTAN DALLAL, M.M. (2016). Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. *New Microbe and New Infect.*, 14(1): 24-30.

GOHAR, M., SHEIKH, A.A., ANJUM, A.A., HUSSAIN, T., MUHAMMAD, J., TABBASSUM, A., KANWAL, A. & SAFDAR, I. (2015). Plasmid profiling and curing of multidrug resistant *Escherichia coli* recovered from retail chicken meat. *J. Anim. Plant Sci.*, 25(4): 984-988.

GOMES, C.A. & MAHLKE, J.D. (2013). Infecção urinária em crianças: perfil das bactérias e suscetibilidade aos antimicrobianos usados nas uroculturas realizadas no laboratório clínico do hospital municipal infantil Santo Antônio em Boa Vista, Roraima. *Caderno de Ciências Biológicas e da Saúde*, 2:1-13.

GONÇALVES, L.F., MARTINS-JUNIOR, P.O., MELO, A.B.F., SILVA, R.C.R.M., MARTINS, V.P., PITONDO-SILVA, A. & CAMPOS, T.A. (2016). Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *J. Glob. Antimicrobiol. Resist.*, 6(1): 1-4.

JEYASANTA, K.I., AIYAMPERUMAL, V. & PATTERSON, J. (2012). Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in sea foods of Tuticorin Coast, Southeastern India. *Advan. Biol. Res.*, 6(2): 70-77.

KUMAR, R., SURENDRAN, P.K. & THAMPURAN, N. (2010). Rapid quantification of *Salmonella* in seafood using real-time PCR assay. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3): 569-573.

KRUMPERMAN, P.H. (1983). Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 165-170.

MANJUSHA, S. & SARITA, G.B. (2013). Characterization of plasmids from multiple antibiotic resistant *Vibrios* isolated from molluscan and crustacean of Kerala. *Int. Food Res. J.*, 20(1): 77-86.

MOLINA-AJA, A., GARCÍA-GASCA, A., ABREU-GROBOIS, A., BOLÁN-MEJÍA, C., ROQUE, A. & GOMEZ-GIL, B. (2002). Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 213(1): 7-12.

NASCIMENTO, E.D. & ARAÚJO, M.F.F. (2014). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Rev. Ambient. Água*, 9(2): 239-249.

NASCIMENTO, V.A., MITTARAQUIS, A.S.P., TRAVÁLIA, B.M., SANTOS, R.C.A., NUNES, M.L. & AQUINO, L.C.L. (2011). Qualidade microbiológica de moluscos bivalves - sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. *Sci. Plena*, 7(4): 1-5.

RAUFU, I.A., LAWAN, F.A., BELLO, H.S., MUSA, A.S., AMEH, J.A. & AMBALI, A.G. (2014). Occurrence and antimicrobial susceptibility profiles of Salmonella serovars from fish in Maiduguri, sub-Saharan, Nigeria. *Egypt. J. Aquat. Res.*, 40(1): 59-63.

RAHIMI, E.H., SHAKERIAN, A. & FALAVARJANI, G.A. (2013). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. *Comp. Clin. Pathol.*, 22(1): 59-62.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S. & GOMES, R.A.R. (2010). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. São Paulo: Varela.

TAYH, G., SALLEM, R.B., YAHIA, H.B., GHARSA, H., KLIBI, N., BOUDABOUS, A. & SLAMA, K.B. (2016). First report of extended-spectrum b-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli in Gaza Strip, Palestine. *J. Glob. Antimicrobiol. Resist.*, 6(1): 17-21.

VIVANT, A.-L., BOUTIN, C., PROST-BOUCLE, S., PAPIAS, S., HARTMANN, A., DEPRET, G., ZIEBAL, C., ROUX, S.L. & POURCHER, A.-M. (2016). Free water surface constructed wetlands limit the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in the natural environment. *Water Res.*, 104 (1): 178-188.

YAN, H., LI, L., ALAM, M.J., SHINODA, S., MIYOSHI, S. & SHI, L. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in retail foods in northern China. *Int. J. Food Microbiol.*, 143(3): 230-234.

ZHANG, J., YANG, X., KUANG, D., SHI, X., XIAO, W., ZHANG, J., GU, Z., XU, X. & MENG, J. (2015). Prevalence of antimicrobial resistance of non-typhoidal Salmonella serovars in retail aquaculture products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1(210): 47-52.