SOLANGE LESSA NUNES

***Salmonella* spp. ISOLADAS DE ÁGUA E MOLUSCOS BIVALVES DE
REGIÕES PORTUÁRIAS BRASILEIRAS – SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
SOROGRUPOS (A - D1, B E C2-C3).**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa Dra Irma Nelly Gutierrez Rivera

São Paulo
2007

SOLANGE LESSA NUNES

***Salmonella* spp. ISOLADAS DE ÁGUA E MOLUSCOS BIVALVES DE
REGIÕES PORTUÁRIAS BRASILEIRAS – SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
SOROGRUPOS (A - D1, B E C2-C3).**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

**São Paulo
2007**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Solange Lessa Nunes.

Título da Dissertação: *Salmonella* spp. Isoladas de água e moluscos bivalves de Regiões Portuárias Brasileiras – Suscetibilidade Antimicrobiana e Caracterização Molecular dos Sorogrupos (A - D1, B E C2 - C3). .

Orientador(a): Irma Nelly Gutierrez Rivera.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,**
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**“ Senhor fazei de mim um instrumento
de Vossa paz, consentindo que eu
semeie amor onde haja ódio e fé onde
haja duvida, verdade onde haja
mentira, luz onde haja trevas e alegria
onde haja tristeza...”**

**Trecho inicial da
Oração São Francisco de Assis**

Ao meu marido por todo incentivo e apoio e
Aos meus pais por serem meu alicerce,

AGRADECIMENTOS

À Dra. Irma N. G. Rivera pela oportunidade, desenvolvimento e amadurecimento, deste trabalho em seu laboratório.

À Profa. Dra. Bianca Zingales, do departamento de Parasitologia do Instituto de Química da USP (IQ/USP), pelos empréstimos, amizade, carinho e consideração, possibilitando o meu partilhamento de seus preciosos conhecimentos, auxiliando e encaminhando minha conduta na vida científica e acadêmica, muito obrigado.

Ao marido, companheiro e amigo de todo o momento, Marcelo, pelo suporte técnico e profissional, pela compreensão, e palavras de sabedoria nos momentos mais difíceis do desenvolvimento deste trabalho.

A minha família pelo apoio incondicional e por me incentivar em todos os momentos, fornecendo base e sustento para minhas realizações pessoais, especialmente meus pais Hélios e Conceição por eu ser quem sou, e irmãs, Mônica e Elaine pelo auxílio moral e pessoal.

Aos amigos Aurélio Pedroso, César, Camila, Margot e Susan do Instituto de Química (IQ), pela amizade e troca de conhecimentos.

As amigas e companheiras de laboratório de Microbiologia Ambiental do ICB Caroline, Mariela, Bianca, Claudiana, Lílian, Gislaine e Renata, um agradecimento especial pela compreensão, carinho, auxílio, ensinamento, aprendizado, pela amizade e ensinamentos diários, mas principalmente pela equipe de trabalho que se formou, laços eternos de amizade.

A amiga e técnica Zelma, pelo carinho, conselhos e por me ensinar muito nestes anos de convívio.

A amiga e madrinha Alexandra Papasidero (Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo) pelos ensinamentos de uma vida inteira;

Dra. Keili Cardoso de Sousa, obrigada pela revisão, carinho, amizade e aprendizado.

A Dra. Sueli Fernandes e Dra. Ana Terezinha Tavechio, Seção de Bacteriologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelos ensinamentos em sorologia e pela identificação sorológica das cepas estudadas.

A Dra. Mônica da Seção de Cultura de cepas do IAL/SP, pelas cepas controle utilizadas no ensaio de PCR.

A Sandra, Michele, Ana Carol e Ema do laboratório da Dra. Vivian (ICB), pela amizade.

As amigas do Laboratório de Genética de Microrganismos do ICB e ao laboratório, Cleide, Karen e Charlotte muito obrigada pelo carinho e suporte da tese.

Aos amigos do laboratório de Micologia da Dra. Claudete do ICB, Luciana, Mauro, Ericles, Amanda, Débora e Satiko pela amizade.

Aos funcionários Seu Luis, Rosa, Kazui e Norma, pelo carinho e auxílio nestes anos de jornada,

Alice, por ser tão amiga, presente, companheira.

Aninha, Naíde e Jacinta obrigado pelo seu carinho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro recebido no trabalho de tese.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

RESUMO

No presente estudo, analisou-se a presença e a suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. em amostras de águas e moluscos bivalves coletados na área de sete portos brasileiros nos anos de 2002 e 2003 (Portos de Belém/PA, Paranaguá/PR, Recife/PE, Santos/SP, Itaguaí/RJ, Fortaleza/CE e Rio Grande/RS). *Salmonella* spp. foi isolada em 20% (18) das amostras de água e em 19% (04) das amostras de bivalves (coletados em todos os portos, exceto o de Belém). Houve isolamento de *Salmonella* spp. na água da área de quatro portos, sendo que no porto de Belém houve a presença dos sorotipos S. Saintpaul, S. Sandiego (O:4 B), S. Miami e S. Panamá (O:9 D1) (60% das cepas) e S. Albany (O: 8 C2-C3) (25%); no porto de Recife, o sorotipo S. Agona e S. Saintpaul (O: 4 B) (87,5%); em Santos, as cepas isoladas, em sua maioria, pertenciam a S. Livingstone (O: 7 C1) (77,5%) e no porto de Paranaguá, as maiores ocorrências estavam associadas aos sorotipos S. Anatum e S. Give (O: 3,10 E1) (36,5%) e S. Saintpaul, S. I 1,4,12:e,h:- e S. 4,5,12:e,h:- (O: 4 B) (32,3%). Nos quatro portos, a presença de *Salmonella enterica* sorovar Saintpaul foi observada. Nestes portos, 95,6% (197) das cepas revelaram resistência até a dez agentes antimicrobianos, sendo que houve a prevalência do fenótipo **ATMCTXAMPCRXCAZ**. Na análise das 21 amostras de moluscos bivalves coletadas em seis áreas portuárias, a presença de *Salmonella* spp. foi observada em três amostras da região portuária de Santos e em uma amostra do entorno do porto de Recife, sendo 50% (04) cepas de *Salmonella* sorovar Typhimurium. Os sorotipos S. Saintpaul, Panama e Livingstone isolados de amostras de bivalves das espécies *Anomalocardia brasiliiana* e *Perna perna* provenientes de Santos, foram resistentes até a três agentes antimicrobianos. Na caracterização molecular das 214 cepas de *Salmonella*, utilizando-se o grupo genético *rfb*, específico para os principais sorogrupos (A-D1, B e C2-C3) da subespécie I de *Salmonella*, 41,1% (88) delas apresentaram relação. O presente estudo demonstrou a presença de sorovariedades de *Salmonella enterica* em quatro dos sete portos analisados. Portanto, medidas preventivas devem ser tomadas, como a realização de programas de vigilância nas áreas portuárias brasileiras, com o intuito de evitar a disseminação destes patógenos através da água de lastro de navios e também, evitando que atinjam áreas de balneabilidade ou aquicultura.

ABSTRACT

In this study, we analysed the presence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. in water and bivalves samples collected from seven Brazilian port areas in 2002 and 2003 (Ports of Belém/PA, Paranaguá/PR, Recife/PE, Santos/SP, Itaguaí/RJ, Fortaleza/CE e Rio Grande/RS). *Salmonella* spp. was isolated in 20% (18) of the water samples and in 19 % (04) of the bivalves samples (collected in all ports, except Belém). It was isolated *Salmonella* spp. from the water of four ports, being that in the Belém port there was the presence of the serogroups O: 4 e O: 9 (60% from the strains) and O: 8 (25%); in the Recife port, the serogroup O: 4 (87,5%); in Santos port, the strains isolated were from the serogroup O: 7 (77,5%) and in Paranaguá port, the majority of them were from the serogroups O: 3,10 (36,5%) and O: 4 (32,3%). In these four ports, it was observed the presence of the *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. In these areas, 95,6% (197) from the strains were resistant until to ten antimicrobial agents and the phenotype **ATMCTXAMPCRXCAZ** was prevalent. From the analyses of 22 bivalves samples collected in six port areas, *Salmonella* spp. was isolated from three samples of Santos port area and in one sample from Recife port, being 50% (04) *Salmonella* sorovar Typhimurium. The serotypes S. Saintpaul, Panama e Livingstone, isolated from bivalves of the species *Anomalocardia brasiliiana* and *Perna perna* from Santos port, were resistant until to three antimicrobial agents. In molecular characterization of the 214 *Salmonella* strains, using the genetic group *rfb*, specific to this main serogroups (A-D1, B e C2-C3) of subspecies I in *Salmonella*, 41,1% (88) of them presented a positive reaction this groups. This study demonstrated the presence of serovars of *Salmonella enterica* in four from seven ports analysed. Thus, preventive measures must be undertaken, as the surveillance programs in Brazilian port areas, aiming to avoid the spread of this pathogen by ballast water and also, avoiding the damage to balneability and marine/fresh water cultivation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
I – ANÁLISE DA LITERATURA	16
Gênero <i>Salmonella</i>	16
Nomenclatura e divisão	17
Aspectos Clínicos das Infecções por <i>Salmonella</i> tifóide e não tifóide	21
Epidemiologia de <i>Salmonella</i> tifóide e não tifóide	22
II. ECOLOGIA DE <i>Salmonella</i> spp.	25
III. CARACTERIZAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp.	28
Suscetibilidade a agentes antimicrobianos	28
Caracterização dos Principais Sorogrupos A-D1, B C2-C3 e do Gênero <i>Salmonella</i>	29
IV. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE ÁREAS PORTUÁRIAS BRASILEIRAS	32
PORTO DE BELÉM/PA	33
PORTO FORTALEZA/CE	34
PORTO DE ITAGUAÍ/RJ	34
PORTO DE PARANAGUÁ/PR	35
PORTO DE RECIFE/PE	35
PORTO RIO GRANDE/RS	36
PORTO DE SANTOS/SP	36
SAÚDE DA POPULAÇÃO E SAÚDE AMBIENTAL DAS ÁREAS SELECIONADAS	37
OBJETIVOS	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
1. Seleção de Portos	41
1.2. Pontos de Coleta	42
2. Coleta de Amostras	42
2.1. Água	42
3. Análise Microbiológica das Amostras de Água	42
3.1. Contagem de Coliformes Termotolerantes (CT _T)	42
3.2. Contagem de Enterococos fecais (EF)	43
3.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	43
4. Análise Microbiológica de moluscos bivalves	44
4.2. Coleta	44
4.3. Tratamento das Amostras	45
4.4. Identificação dos espécimes coletados	45
4.5. Análise Microbiológica das Amostras de Molusco Bivalve	45
4.5.1. Contagem de Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (CT _T)	45
4.5.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em Amostras de Molusco Bivalve	46
5. Ensaio de suscetibilidade frente a agentes antimicrobianos	46
5.1. Antibióticos Seleccionados	46
5.2. Preparo do Inoculo	47

6. Sorologia Confirmativa pelo Esquema de Kauffmann-White e Caracterização Sorológica Molecular dos sorogrupos e sorotipos identificados de <i>Salmonella</i> spp em amostras de água do mar e molusco bivalve	47
6.1. Sorotipagem dos isolados de <i>Salmonella</i> spp	47
6.2. Caracterização sorológica molecular dos sorogrupos	48
6.2.1. Extração de DNA	48
6.2.2. Qualidade e concentração de gDNA	48
6.2.3. Caracterização molecular usando agrupamento genético <i>rfb</i> pela técnica de uniplex PCR	48
6.2.4. Condições de Amplificação	49
6.2.5. Eletroforese	50
6.2.6. Tratamento dado aos resultados dos tamanhos gerados dos amplicons obtidos pela técnica de <i>rfb</i>PCR	50
V. RESULTADOS	51
V.1. <i>Salmonella</i> spp e indicadores de contaminação fecal em amostras de água portuária	51
V.2. <i>Salmonella</i> spp e indicadores de contaminação fecal em amostras de bivalves	53
V.3. Suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas em amostras de água e moluscos bivalves	58
V.4. Caracterização molecular por grupos de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de amostras de água e moluscos bivalves	58
FIGURAS	63
VI. DISCUSSÃO	69
ANEXO	85
REFERÊNCIAS	86

INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* compreendendo bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir da glicose (exceto *Salmonella* Typhi), desprovidos de oxidase e redutores de $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ (nitrato em nitrito), produtores de H_2S , capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita a *S. pullorum* e a *S. gallinarum*, naturalmente imóveis (KAUFFMANN, 1972; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

No cômputo geral, o gênero *Salmonella* apresenta 2.501 sorovares ou sorotipos, tendo o maior número de representantes na subespécie *enterica* com 1.478 (59%), distribuídos predominantemente entre os sorogrupos A (O:2), B (O:4); C1(O:7); C2-C3 (O:8); D1 (O:9) e E1 (O:3,10), responsáveis por 97% das infecções humanas e de animais homotermos (BRENNER et al., 2000; POPOFF, 2001).

Salmonella têm sido isoladas de humanos e de quase todos os animais em todo o mundo, causando infecções como gastroenterite severa e autolimitada, febre tifóide, bacteremia, aborto, meningite, doença respiratória, osteomielite e outras infecções localizadas (BUXTON and FRASIER, 1977; MILLER et al, 1995; GRAY, 1995). Considerando-se o caráter zoonótico da *Salmonella* e sua ampla distribuição no ambiente, as salmoneloses podem ser uma das infecções com tendência a aumentar, mesmo em países com boas condições de saneamento básico (FERNANDES et al. 1992; HOFER et al., 1998; ALMEIDA et al., 2000).

Em todo mundo, infecções causadas por *Salmonella* caracterizam um problema de saúde humana e/ou animal (SILLIKER, 1982) e a complexa rota pela qual o gênero circula no ambiente, sugere a água como fundamental na sua transmissão, sendo encontradas desde a estação de tratamento de esgotos, como também em despejos industriais e até mesmo em águas superficiais (KAMPELMACHER, 1977; REILLY et al., 1981). Além disso, o microrganismo pode sobreviver até 87 dias em águas de abastecimento público, 115 dias em solo de jardim, 28 meses em fezes de aves infectadas e acima de 30 meses em esterco seco bovino (MORSE & DUNCAN, 1974).

Os ecossistemas aquáticos, que incluem águas doces (fontes, lagos, rios), estuários e oceanos, possuem uma biota microbiana autóctone e outros

microrganismos transitórios que chegam através do ar, solo ou de despejos industriais e domésticos. Eventos como a globalização, o desenvolvimento industrial, o impacto do crescimento demográfico e ocupação do solo de forma intensa e acelerada têm provocado o comprometimento dos recursos hídricos disponíveis para o consumo humano e fins recreacionais, aumentando consideravelmente o surgimento de doenças de veiculação hídrica (RIVERA E MARTINS, 1996; SAKER ET. A 2004; FORSHELL AND WIERUP, 2006).

O ambiente marinho costeiro pode ser contaminado tanto com excretas humanas quanto de animais portadores de *Salmonella* e que atingem o ecossistema marinho por diversas vias, tais como água dos rios, das chuvas que promovem lixiviação de fezes animais presas em substratos sólidos como solos e rochas, ventos e a mudança do ciclo das marés. Por fim, estas bactérias neste ambiente acabam sendo concentradas pelos organismos bivalves (BAUDART et al., 2000; UTARZA-MARTINEZ et al., 2004[A]).

Os bivalves representam um bom receptáculo para a concentração de microrganismos, que são retidos durante o processo de filtração da água. Desta forma, constituem um risco sanitário para o consumidor que ingere o produto “in natura”. A fisiologia nutricional dos bivalves baseia-se na ingestão de plâncton, chegando a filtrar de 2 a 5 Litros/hora (LOPES et al., 1979). Dados atuais revelam que os moluscos bivalves em seu processo de alimentação podem até mesmo filtrar de 19 a 50 Litros/hora da água, acumulando todos os contaminantes biológicos e químicos dispersos no ecossistema em seu conteúdo intravalvar (MENEZES et al., 2002).

A microbiota dos bivalves reflete a qualidade microbiológica da água onde são cultivadas e podem ser utilizados como modelo de estudo de poluição fecal de um determinado ecossistema marinho ou estuarino (LOPES et al., 1979; MENEZES et al., 2002). Apesar da presença de *Salmonella* em ambientes aquáticos constituírem um potencial problema em saúde humana, somente sorotipos patogênicos estão comumente relacionados com um grande número de surtos oriundos de água e alimentos (RUIZ et al., 1995; USERA et al., 1995; CLARK et al., 1996; KRAMER et al., 1996).

Devido ao elevado número de sorotipos entéricos de *Salmonella* envolvidos em infecções humanas, além da sorotipagem, outras metodologias como

fagotipagem, caracterização molecular (16S rRNA, gene *rfb* e o fragmento *IS200*) e a pesquisa de fatores associados à virulência (*Salmonella-specific DNA pathogenicity islands* [SPI]) (GROISMAN et al., 1999), podem auxiliar na determinação do risco microbiológico da presença de *Salmonella* no ambiente aquático e também na determinação de um marcador genético para uso em estudos epidemiológicos (VERMA and REEVES, 1989; LUK et al., 1993).

Os objetivos deste estudo foram identificar os principais sorotipos e grupos sorológicos, bem como o perfil de resistência a antimicrobianos, de *Salmonella* circulantes em águas e moluscos bivalves extraídos de reservas de bancos naturais de sete áreas portuárias brasileiras. Além disso, pretendeu-se também avaliar a utilização de marcadores baseados em DNA (agrupamento genético *rfb* específico para a estrutura do lipolissacáride do gênero *Salmonella*) na identificação e diferenciação dos principais sorogrupos entéricos de *Salmonella* (A - D1, B e C2-C3). Dentro dos resultados apresentados e discutidos esperamos possibilitar a análise e a identificação do risco quanto à presença de *Salmonella* no ecossistema aquático portuário, promovendo um serviço de prevenção de doenças de transmissão hídrica e alimentar e auxiliando a saúde pública.

I – ANÁLISE DA LITERATURA

Gênero *Salmonella*

No cômputo geral, com avanços feitos nos vários estudos taxonômicos e com base em suas características diferenciais, este gênero pode ser distinguido atualmente em 2.501 espécies e subespécies representadas em sorovares ou sorotipos, subdivididos em duas espécies: (1) *S. enterica* dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécie *indica* (VI); e (2) *S. bongori* ou “V”, formalmente denominada *S. enterica* subespécie *bongori* (POPOFF & LE MINOR, 1977; LE MINOR & POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989).

Entre as seis subespécies de *S. enterica*, é na subespécie I que se agrupam o maior número de representantes, com 1.478 (59%), distribuídos predominantemente entre os sorogrupos O: 2, O: 4, O: 7, O: 8, O: 9 e O: 3,10, responsáveis por 97% das infecções humanas e de animais homotermos (BRENNER et al., 2000; POPOFF, 2001).

Os sorotipos de *S. enterica* estão normalmente divididos dentro de dois grupos com base na sua interação com hospedeiros específicos em: a) sorotipos adaptados, que causam geralmente doença sistêmica em um número limitado de espécies animais e em humanos, como por exemplo, a *S. Gallinarum*, *Abortusovis* e *Typhi*; b) sorotipos ubíquos ou não adaptados, como *S. Typhimurium*, que causam infecções tanto em homens como animais, causando gastrointestinais auto-limitadas (UZZAU et al., 2000). Enquanto outras das subespécies de *S. enterica*, II, IIIa, IIIb, IV, VI e na espécie *S. bongori*, são predominantemente associadas a animais de sangue frio e distribuídas no meio ambiente, sendo as infecções humanas acidentais (LE MINOR & POPOFF, 1987).

Na atualidade as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas no campo da saúde pública, devido as suas características de endemicidade, morbidade e em particular pela dificuldade em seu controle. Todo esse quadro decorre de diferentes parâmetros epidemiológicos envolvidos, circunstanciados, principalmente pelas inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo (HOFER et al., 1998).

Sendo assim, a sorotipagem das cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Salmonella* caracteriza uma etapa inicial de grande importância para o rastreamento das salmoneloses, permitindo o reconhecimento da fonte poluidora em uma comunidade e direcionando a ação de programas em vigilância epidemiológica, como instrumento competente na forma de controle do agravo (MARTINS et al., 1988; ALMEIDA et al., 2000; FERNANDES et al., 2006).

Nomenclatura e divisão

Historicamente, nomes de espécies foram arbitrariamente dados para os sorovares por razões convenientemente médicas, sendo assim alguns nomes de sorovar denotam síndrome (*S. Typhi*) ou estão relacionados com síndrome (*S. Paratyphi* A, B, C). Outros correlacionavam síndrome e especificidade a um hospedeiro comum, os quais algumas vezes estavam corretos (*S. abortus-ovis*, *S. abortus-equi*) ou errados em outros casos (*S. typhi-murium*, *S. cholerae-suis*). Para evitar possíveis confusões, nomes indicando a origem geográfica da primeira cepa de um novo serovar (*S. london*, *S. panama*, *S. tel-el-kabir*) foram então utilizados (LE MINOR & POPOFF, 1968) e nomes compostos dos sorotipos (*S. typhi-murium* [*S. typhimurium*]; *S. cholerae-suis* [*S. choleraesuis*], *S. tel-el-kabir* [*S. telelkebir*]) foram condensados em um só nome. Como, erroneamente, foram considerados como espécie, foram escritas com letras itálicas (POPOFF, 2001).

A nomenclatura destas bactérias tem mudado muitas vezes e ainda permanece instável (LE MINOR et al., 1970; 1982B; LE MINOR & POPOFF, 1987; FARMER, III & KELLY, 1991; GRAY, 1995; EUZÉBY, 1997). A classificação de *Salmonella* foi exaustivamente discutida por alguns microbiologistas (BORMAN et al., 1944; KAUFFMANN, 1952). Kauffmann (1948), descreveu 150 ‘sorotipos’ na sexta edição do *Manual Bergey* (KAUFFMANN, 1948), embora, em 1952, ele tenha descrito apenas três espécies, que poderiam ser diferenciadas por testes bioquímicos (KAUFFMANN & EDWARDS, 1952). Em 1980, o *Approved Lists of Bacterial Names* (SKERMAN et al., 1980) citava cinco espécies dentro do gênero *Salmonella*: *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. arizonae* e *S. typhimurium*, dentre mais de 2.000 sorovares do gênero *Salmonella*. Em 1982, baseado em resultados de análises numéricas e hibridação DNA-DNA com 58 cepas padrão de Salmonelas pertencentes ao subgênero I-IV por KAUFFMANN (LE MINOR et al., 1982A), houve a proposta de

combinação de quatro subgêneros de *Salmonella* dentro de uma única espécie, denominada *Salmonella choleraesuis*: *S. choleraesuis* subespécie *choleraesuis salamae*, *S. choleraesuis* subespécie *diarizonae*, *S. choleraesuis* subspécie *houtenae*, *S. choleraesuis* subespécie *bongori* (LE MINOR et al., 1982B; LE MINOR et al., 1985).

Em 1987, Le Minor & Popoff apresentaram uma solicitação para designar *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., sugerindo *S. enterica* como uma única espécie dentro do gênero *Salmonella* e desta maneira, *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, por exemplo, seriam incluídas na espécie de *S. entérica*, que originalmente havia sido a nomenclatura classificatória utilizada por Edwards & Ewing (1963). Nesta ocasião também propuseram, que sete subgêneros de *Salmonella* fossem designados como subespécies (subespécie I, II, IIIa, IIIb, IV, V, e VI). O subgênero III seria dividido em IIIa e IIIb por relação genética e reações bioquímicas. As subespécies de IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*), incluindo os sorotipos “Arizona” H monofásico, e espécies de IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*) contém os sorotipos H difásicos. Todos os sorotipos de “Arizona” haviam sido incorporados dentro do esquema Kauffmann-White por Rhode em 1979, como novas espécies do gênero *Salmonella* (LE MINOR & POPOFF, 1987). Após a submissão da solicitação por Le Minor & Popoff, a Comissão Judicial levou sete anos para se pronunciar sobre que atitude tomar, não aceitando a solicitação enviada pelos pesquisadores (WAYNE, 1984).

Por outro lado, esta proposta de Le Minor & Popoff foi amplamente disseminada entre os microbiologistas, e em 1989, *S. choleraesuis* subsp. *bongori* foi colocada como uma espécie diferente, juntamente com *S. bongori* baseando-se em suas características genotípicas e fenotípicas (LE MINOR et al., 1985).

Entendendo haver uma necessidade na padronização dos estudos envolvendo o gênero e com a instável e frágil nomenclatura das espécies de *Salmonella* spp, ficou estabelecida a recomendação adotada pelo Centro para Controle de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC) (Tabela 1) (BRENNER et al., 2000) e pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – *WHO Collaborating Center*) para a uniformização da nomenclatura usada neste trabalho, assegurando compatibilidade com literaturas anteriores.

Tabela 1 - Nomenclatura de *Salmonella* descrita pelo CDC, 2000^a.

Posição taxonômica	Nomenclatura
Gênero (itálico)	<i>Salmonella</i>
Espécie (itálico)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>enterica</i>, que inclui as subespécies I, II, IIIa, IIIb, IV e VI • <i>bongori</i> (formalmente subespécie V)
Sorotipo (letra maiúscula, não itálica) ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Da primeira vez que um sorotipo é mencionado no texto; o nome deverá ser precedido pela palavra “sorotipo” ou “sor.” • Sorotipos são nominais na subespécie I e designados pela fórmula antigênica nas subespécies II até IV, e VI e <i>S. bongori</i> • Membros das subespécies II, IV e VI e <i>S. bongori</i> mantêm seus nomes desde 1966.

^a Em 1984 Farmer *et al.* atualizaram o sistema de publicação usado pelo CDC para *Salmonella*. A maior das mudanças que o CDC fez e que resultou na diferença publicada no sistema em 1984 são (i) a letra maiúscula no nome do sorotipo, (ii) inclusão das subespécies VI e *S. bongori*, e (iii) adoção do tipo das espécies chamado *S. enterica*.

^b Exemplos de designação de sorotipos são *Salmonella* sorotipo (ser.) Typhimurium, *Salmonella* II 50:b,z₆, *Salmonella* IIIb 60:k:z, e *Salmonella* ser. Marina (IV 48:g, z₅₁).

Segundo as publicações de (LE MINOR et al. 1982 e 1986) e (POPOFF, 2001), a designação para as chaves sorológicas de identificação, ficaram assim estabelecidas:

A) Designação dos grupos O: o grupo do antígeno somático O foi primeiramente determinado por letras do alfabeto, mas posteriormente, foi necessário continuar com números (51 até 67). Os subfatores: 40, 47, 48 e 50, já não são mais mencionados e sua identificação na rotina é desnecessária. Até o momento, os grupos são designados pela utilização do fator O característico e as letras respectivas para os grupos colocadas provisoriamente entre parênteses [ex: O:4 (B); O:18 (K)]. O sorogrupo 54, pela determinação do fator do seu antígeno O, é heterogêneo, sendo codificado por plasmídio em oito sorovares diferentes. Se perder o plasmídio o fator não é mais expresso. Os fatores O e H possuem a mesma simbologia, dentro do esquema descrito por Kauffmann-White, variando bastante nos sorovares.

B) Designação das “fases R” dos antígenos H: Esta especificidade “anormal” dos antígenos H foi descrito primeiramente por Kauffmann (1936) em *S. Typhi* e são designados por R seguido pelo símbolo do fator (ex. Rj para Typhi, Rz₅₀ para

Muenchen). Como algumas fases de R são aglutináveis pelo antissoro – 1,2 – 1,5 – 1,6 – 1,7, mas não com - 2 – 5 – 6 – 7, estes são denominados de R1. A subdivisão R1, 10 – R1, 11, etc, não é mais usada. As “fases R” do antígeno H são incomuns. Sua identificação é frequentemente feita em laboratórios de referência como marcadores epidemiológicos para diferenciação entre os sorovares.

C) Apresentação do Esquema de Símbolos: os símbolos para os fatores somáticos determinados pela conversão fágica são sublinhados (ex: 6, 14, 18). Eles estão presentes somente se a cultura é lisogenizada pelo correspondente fago conversor. Estes fatores são frequentemente adicionados aos presentes nas amostras não convertidas (ex: 6, 7 → 6, 7, 14). No grupo O:3, 10, fatores 15 ou 15, 34 tomam lugar do fator 10. Por esta razão, estes fatores são sublinhados e colocados dentro de colchetes neste grupo. Estes fatores sublinhados são mencionados na tabela para sorovares nos quais eles foram encontrados. É provável que esta situação possa ser encontrada por todos sorovares dentro do mesmo grupo O. Portanto, [] significa que O (não sublinhado) ou H, pode estar presente ou ausente sem relação com o fago conversor, como por exemplo, fator [5] do grupo O: 4 (B). Quando os fatores H estão em colchetes, significa que são excepcionalmente encontrados em cepas selvagens. E quando entre parênteses, mostra que o fator O ou H são fracamente aglutináveis no processo sorológico. O fator capsular (k) correspondente ao fator Arizona H: 22 possuem reação de aglutinação bastante fraca com o soro k monoclonal, mas normalmente são aglutináveis com soro k polivalente (POPOFF, 2001). A presença ou ausência dos fatores acessórios O (sublinhados ou em colchetes) não interfere com o diagnóstico do sorovar. Pelo contrário, estes fatores são interessantes como marcadores epidemiológicos para cepas pertencentes a um mesmo sorovar.

Aspectos Clínicos das Infecções por *Salmonella* tifóide e não tifóide

Salmonella enterica pode causar febres entéricas, gastroenterites e septicemias que atingem tanto o homem quanto espécies animais (LE MINOR, 1984).

O sorotipo *S. Typhi* é o agente etiológico da febre tifóide e sua transmissão associa-se geralmente à água e baixas condições de saneamento básico, bem como de higiene pessoal. Recentemente, alguns programas realizados no sentido de melhorar a qualidade do abastecimento de água e o saneamento básico têm diminuído muito o risco de infecção tifóide e paratifóide (WHO/UNICEF, 2000).

A febre tifóide caracteriza-se como uma doença bacteriana aguda, cujo quadro clínico apresenta-se geralmente com febre alta, cefaléia, mal-estar geral, anorexia, bradicardia relativa (conhecido como sinal de Faget), esplenomegalia, manchas rosadas pelo tronco (roséola tífica), obstipação intestinal ou diarreia e tosse seca, podendo comprometer o sistema nervoso central. A administração de antibióticoterapia mascara o quadro clínico da doença, impedindo o diagnóstico precoce. A febre tifóide possui distribuição mundial, sendo o reservatório, o humano doente ou o portador assintomático. O período de incubação da doença é em média de duas semanas, se mantendo transmissível enquanto existirem bacilos sendo eliminados pela urina e fezes, que geralmente, ocorre desde a primeira semana da doença até o fim da convalescença. O conhecimento de portadores é de extrema importância, pois se sabe que de 2% a 5% dos pacientes após a cura, continuam a eliminar *S. Typhi* por períodos longos, principalmente mulheres, com histórico de litíase biliar. A doença acomete com maior frequência a faixa etária entre 15 e 45 anos em áreas endêmicas e a taxa de ataque diminui com a idade. A suscetibilidade é maior em indivíduos com acloridria gástrica. Nas últimas décadas observou-se o declínio nos coeficientes de incidência, mortalidade e letalidade da febre tifóide no Brasil. Porém estas informações devem ser analisadas com cautela, tendo em vista o importante sub-registro de casos ⁽¹⁾.

Os sorotipos e grupos de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* ubíquos ou não adaptados a hospedeiros específicos, são também denominados de não tifóides, constituindo-se na principal causa de salmonelose humana veiculada pela água ou alimentos contaminados por fezes infectadas (UZZAU et al., 2000).

¹ A coleção institucional do Ministério da Saúde utilizada como referencia neste estudo pode ser acessada em: www.saude.gov.br/bvs.

A contaminação humana com os sorotipos de *Salmonella enterica*, é considerada acidental, uma vez que alguns sorovares demonstram bastante especificidade por seus hospedeiros animais, por exemplo, *S. Gallinarum* e *Pullorum*, responsáveis por salmonelose em aves, dificilmente identificada em salmoneloses humanas (UZZAU et al., 2000; FORSHELL AND WIERUP, 2006); *S. Choleraesuis* causa sintomas semelhantes à gastroenterite humana somente em suínos (HERIKSTAD et al., 2002; BESSA et al., 2004); *S. Infantis* são comumente associadas a eqüinos (TILLOSON et al., 1997), *S. Derby*, *Agona*, *Anatum*, *Senftenberg*, *Saintpaul* e *Livingstone*, são frequentemente isoladas de flocos e grãos como também em rações para engorda animal, entre outros sorovares (HOFER et al., 1997; HOFER et al., 2000). O mecanismo de patogenicidade destes sorotipos ainda permanece incerto (FERNANDES et.al., 1992; TILLOSON et al., 1997; UZZAU et al., 2000; HERIKSTAD et al., 2002; FERNANDES et al., 2006).

Epidemiologia de *Salmonella* tifóide e não tifóide

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa global de casos de febre tifóide é de cerca de 16 milhões de doentes e 600.000 mortes anualmente (WHO, 1996).

Dados epidemiológicos levantados em 22 localidades em países da Ásia, África, América Latina, Caribe, América do Norte e Oceania, revelaram que a ocorrência por febre tifóide notificada numa população total de 6.091.349.000 é da ordem de 21.650.974 por ano ($> 100/100.000$ casos/ano), sendo considerada ainda de alta incidência nos países subdesenvolvidos analisados neste levantamento (CRUMP et al., 2000).

Para melhor entender a epidemiologia das infecções causadas por *Salmonella*, um programa de vigilância epidemiológica avaliou dados de 191 países (América do Norte e Latina, África, sudeste da Ásia, Leste do Mediterrâneo, Oeste do Pacífico e Europa) durante cinco anos, apontando a prevalência de 76.1%, especificamente, de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhi* até 1995 (HERIKSTAD et al., 2002).

Em todo o mundo, casos de surtos de origem alimentar, que envolvem alimentos de origem marinha e *Salmonella* não tifóide, vêm aumentando em grandes

proporções causando doenças de origem alimentar (CDC, 2000; MARTINEZ-URTAZA et al., 2003; BRANDS, et al., 2005).

Nas últimas décadas, as salmoneloses envolvendo consumo de alimentos de origem animal apontam particularmente a prevalência dos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* tanto em países industrializados e desenvolvidos quanto em desenvolvimento (POPPE, 1999; SCUDERI, 1999; WALL and WARD, 1999, FERNANDES et al, 2006).

Em 1996, foi descrito em cinco Estados da Austrália um surto por consumo de manteiga de amendoim associado ao sorotipo *S. Mbandaka* (NG et al., 1996; SCHEIL, 1998) e a análise microbiológica das marcas comumente consumidas identificou contaminação em todas com menos de três células de *S. Mbandaka*/grama. Outros sorotipos como *S. Senftenberg* e *Agona* foram identificados em um subsequente surto que ocorreu em Israel, também por consumo de manteiga de amendoim que havia sido importada do Reino Unido (KILLALEA et al., 1996). O surto ocorrido na Austrália foi o primeiro no mundo envolvendo este tipo de alimento (BURNETT et al., 2000).

Entre 2000 e 2002, a OMS através do *WHO Global Salm-Surv*, realizou um levantamento sobre surtos de origem alimentar envolvendo *Salmonella* no continente Africano, Asiático, Europeu, Norte Americano e na América Latina e Caribe (exceto Brasil e alguns países da América do Sul). Foram relatados cerca de 377.000 surtos de origem humana e 66.000 de fonte não humana e envolviam diversos sorotipos de *S. enterica*, com localização geográfica definida, porém, em todos os países relacionados prevaleceu o sorotipo *S. Enteritidis* seguido por *S. Typhimurium* (GALANIS et al., 2006). Somente nos países da União Européia, no ano de 2004, a salmonelose humana de origem alimentar teve um índice de 192.703 casos (EFSA, 2006). O CDC estima que o número anual de salmoneloses nos Estados Unidos seja de aproximadamente 1.4 milhões de casos (MEAD et al., 1999).

Ultimamente, a emergência de uma cepa do sorotipo *S. Typhimurium* DT (*definitive type*) 104 ou comumente denominada de MRDT104, com fatores de múltipla resistência aos principais agentes antimicrobianos, tem preocupado países da comunidade européia e Estados Unidos, pois vem sendo identificado em diferentes fontes e causando infecções tanto humanas quanto animais, com extensas complicações (NASTASI and MARMINA, 2001; HELMS et al., 2002; DOUBLET

et al., 2003; ZHAO et al., 2003; O'BRIEN and VALK, 2003; HSUEH et al., 2004; VARMA et al., 2005; POLITI et al., 2005). Num trabalho realizado na Galícia, esta cepa em particular, foi isolada no ambiente marinho e em organismos bivalves (MARTINEZ-UTARZA et al., 2004 [A, B]). Contudo, o sorotipo multiresistente *S. Typhimurium* DT104 ainda não foi descrita no Brasil (TÉO e OLIVEIRA, 2005).

No Brasil, dentre as doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHAs), a febre tifóide é de notificação compulsória aos Centros de Vigilância Epidemiológica Estaduais, de acordo com a Portaria N° 5 de 21 de Fevereiro de 2006 (DOU, 2006). Os casos são registrados em todas as regiões, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Entre 1999 e 2004, ocorreu a notificação de 13. 582 casos de febre tifóide e paratifóide nas 27 Unidades Federativas do país (CARMO et al., 2005).

As infecções por *Salmonella* de origem não tifóide notificados no Brasil, geralmente ocorrem por veiculação alimentar. Entre 1999 e 2004, um total de 186.776 surtos por *Salmonella* spp foram registrados pelo Ministério da Saúde, através da implantação do programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA). Os Estados que mais contribuíram com notificações foram os Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, sendo que 34,7% (202) das notificações eram devido à *Salmonella* não tifóide (CARMO et al., 2005). Em 2000, foram notificados 27 surtos por *Salmonella* spp veiculados por alimentos no Estado de São Paulo (SILVA, 2005).

O rastreamento sorológico das salmoneloses e da febre tifóide no Estado de São Paulo é realizado desde 1950 por laboratórios de referência e investigação dos surtos notificados (TAUNAY et al., 1996). Houve a prevalência de *S. Typhi* nos surtos ocorridos até 1970, até o início dos anos 90, o sorotipo *S. Agona* prevaleceu e a partir da década de 90 os sorotipos de maior frequência nos surtos do Estado, passaram a ser *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (FERNANDES et al., 2006). Em um levantamento realizado no município de São Paulo entre 1990 e 1995, os sorotipos *S. Sandiego* e *S. Rubislaw* representaram apenas 11,0% e 1,6% dos isolados de amostras clínicas humanas, respectivamente (TAVECHIO et al., 1996).

Em outros Estados brasileiros, diversos trabalhos realizados destacam o isolamento de diferentes sorotipos de origem humana e não humana, observando-se a presença do sorotipo *S. Typhimurium*, principalmente nos Estados que compõe a região Sul e Sudeste do país (LEAL et al., 1987; LOUREIRO, 1990; HOFER e REIS, 1994;

TAVECHIO et al., 1996; TAUNAY et al., 1996; MELO et al., 1997; HOFER et al., 1997; HOFER et al., 1998; HOFER et al., 2000; VIEIRA et al., 2001; LÁZARO, et al., 2004; BESSA et al., 2004; FERNANDES et al., 2006).

No Rio Grande do Sul, um relatório de ETAs (Estações de Tratamento de Água), mostra que entre os anos de 1987 e 1998, houve um total de 261 isolados de *Salmonella* spp como agente etiológico de surtos.

No Paraná, *Salmonella* spp foi confirmada em 256 surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 1978 a 1999.

Em Recife, no Estado de Pernambuco, durante o triênio 1978-1980, foram realizados isolamentos de 1.720 cepas de *Salmonella* spp em episódios entéricos humanos, sendo 1.387 caracterizadas sorologicamente. O estudo identificou 63 sorotipos concentrados no grupo sorológico B (73,18%). A maior frequência foi de *S. Typhimurium* (B), *S. Saintpaul* (B), *S. Poona* (G), *S. Derby* (B), *S. Agona* (B), *S. Newport* (C2-C3), *S. Oranienburg* (C1), *S. Infantis* (C1), *S. Tshiongwe* (C2-C3) e *S. Ndolo* (D1), representando 88,75% (1.231) das cepas identificadas (LEAL et al., 1987).

II - Ecologia de *Salmonella* spp.

A pesquisa sobre a ecologia dos diversos sorotipos de *Salmonella* envolvidos em infecções humanas e animais foi realizada em diversos estudos.

Com base em dados bacteriológicos e epidemiológicos, alguns pesquisadores concluíram que a presença de microrganismos entéricos no ambiente aquático poderia constituir risco a saúde pública e que o isolamento de *Salmonella* de água do mar deveria ser considerado uma evidência da ampla disseminação destes microrganismos na comunidade (MOORE et al., 1952; GREENBERG et al., 1956).

A pesquisa envolvendo este gênero bacteriano sempre esteve relacionada com a detecção de salmonelas de origem humana, principalmente *S. Typhi*, em águas e esgotos (WILSON & BLAIR, 1927). A importância da pesquisa de salmonelas de origem animal em esgotos e águas poluídas somente foi considerada a partir de 1941, com os estudos de FERRAMOLA & MONTEVERDE.

Em uma pesquisa de *Salmonella* em água do mar e estuários, em 1952 na Alemanha, isolou-se *S. Paratyphi*, *S. Typhi* em menor frequência e foram relatados

também isolamentos de *S. Panamá*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Bredeney*, *S. Bovismorbificans* e *S. Thompson* (STEINIGER, 1952). Buttiaux & Leurs, em 1953, estudaram a viabilidade de salmonelas em água do mar e verificaram uma maior resistência dos sorotipos Paratyphi e Enteritidis.

Nas décadas de 60 e 70, pesquisas em todo o mundo foram realizadas no sentido de padronizar o volume adequado de água marinha que deveria ser concentrada pela técnica de membrana filtrante, para que fosse possível o maior isolamento do número de células viáveis do gênero *Salmonella*, e também determinar a metodologia que melhor agregasse células tipáveis sorologicamente deste gênero. Neste sentido, padronizações com e sem pré-enriquecimento em diferentes caldos, incluindo Água Peptonada Tamponada (APT) 1%, incubados em diferentes temperaturas (de 35° C até 45° C), caldos seletivos variados que também foram incubados por 24 horas até cinco dias com variações máximas e mínimas de temperatura e diversos meios sólidos de seleção foram utilizados. Contudo, nenhuma conclusão foi evidenciada, gerando extensa avaliação e discussão até os dias atuais, sobre qual a metodologia mais adequada para o isolamento e identificação sorológica do gênero *Salmonella* (COETZEE, 1963; LIVINGSTONE, 1969; GRENNET & NIELSEN, 1969; BREZENSKI, 1970; GELDREICH, 1970; MECHALAS et al., 1972; CABELLI et al., 1974; NASCIMENTO et al., 2000).

Apesar de toda subjetividade e antagonismo das metodologias aplicadas para detecção de salmonelas no ambiente aquático, a importância da pesquisa deste gênero neste ambiente, reflete não apenas na epidemiologia dos sorotipos isolados, como também na melhor compreensão da ecologia dos sorotipos de *Salmonella* identificados, tamanha sua ubiquidade.

No Estado de São Paulo, em estações de tratamento de água e esgoto, água doce e em amostras de água e moluscos bivalves coletados de bancos naturais nos municípios localizados no litoral houve a prevalência da circulação do sorotipo *S. Typhimurium*, corroborando com os levantamentos epidemiológicos realizados no Estado (MARTINS, 1979; LOPES et al., 1979). Já em um estudo realizado no litoral Sul de São Paulo, em 1998 e 1999, analisando-se amostras de água marinha e ostra (*Crassostrea brasiliiana*), constatou-se a frequência dos seguintes sorotipos: *S. Sandiego*, *S. Rubislaw* e *S. Houtenae* nas amostras de água e *S. Houtenae* em uma amostra de ostra originária do mangue (RISTORI, 2000).

Nas águas das praias do Rio de Janeiro e também no sistema de esgoto da cidade de Niterói foi identificado o sorotipo *S. Agona* (HOFER & COSTA, 1972; RODRIGUES et al., 1989). Ainda no Estado do Rio de Janeiro, uma pesquisa realizada em abatedouro de suínos identificou *S. Muenster* como sorotipo de maior prevalência (LÁZARO et al., 2004).

Em Fortaleza, a Universidade Federal do Ceará realizou estudos para avaliar a água do mar nas praias turísticas de Volta da Jurema e Mucuripe (MELO et al., 1997) e também a areia das praias Mucuripe, Futuro e Caça e Pesca (VIERA et al., 2001). Foram isoladas duas cepas de *Salmonella* sorovar *Agona* nas amostras de areia de Mucuripe e uma cepa do mesmo sorovar coletada de água do mar em Mucuripe, demonstrando que a presença deste sorotipo é evidentemente circulante do ambiente marinho de Fortaleza.

LOUREIRO (1990) obteve 411 isolados de *Salmonella* de indivíduos residentes em diferentes áreas da região amazônica, investigados no período entre 1975 a 1986. Na ocasião, a pesquisa também foi realizada em isolados de animais silvestres típicos da região amazônica e da água do esgoto, principalmente no Município de Belém/PA. Foram identificados 68 sorovares de *Salmonella* nas amostras com origem em infecção humana, dentre os quais prevaleceram *S. Typhi* (sorogrupo D1), *S. Give* (E1), *S. Typhimurium* (B), *S. Anatum* (E1), *S. Agona* (B), *S. Miami* (D1) e *S. Newport* (C2-C3). Nos isolados de origem animal e da água do esgoto analisados, houve prevalência de alguns sorotipos: *S. Give*, *S. Anatum*, *S. Miami*, *S. Newport*, *S. Saintpaul* e *S. Sandiego*, *S. Panamá*, *S. Infantis* e *S. Grumpensis*. Observa-se que alguns destes sorotipos relacionaram-se com aqueles identificados em amostras humanas pesquisadas, provando a circulação em diferentes nichos de alguns sorovares nesta região brasileira.

Em pesquisas realizadas em ambiente avícola em alguns Estados brasileiros entre 1962 e 1991, diferentes sorovares pertencentes à subespécie de *Salmonella enterica* foram identificados. Os que ocorreram com maior frequência foram *S. Anatum*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Cerro*, *S. Agona* e *S. Livingstone* e estiveram associados principalmente com a ração e aves biopsiadas, (HOFER et al., 1997; HOFER et al., 1998).

Nas décadas de 60 e 70, um abatedouro e frigorífico no Estado de Pernambuco, que processava e exportava carne equina para países como Europa e

Japão, foi investigado com relação à qualidade do material processado. Foram isolados neste ambiente 745 sorotipos de *Salmonella*, sendo 98 identificados do ponto de vista antigênico e predominando a subespécie I (98,9%). Os sorotipos de maior prevalência foram: *S. Anatum*, *S. Carrau*, *S. Agona*, *S. Saintpaul* e *S. Typhimurium* (HOFER et al., 2000).

No setor avícola do Estado do Rio Grande do Sul, a substituição do sorotipo *S. Hadar* por *S. Enteritidis* foi observada em sua planta de produção nas últimas décadas, sendo concomitantemente isolados os sorotipos *S. Anatum* e *S. enterica* 3,10: e, h:- (BAÚ et al., 2001). Em toda região Sul, no setor avícola, ocorreram em maior frequência: *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Derby* e *S. Bredeney* (BESSA et al., 2004).

III - CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* spp.

Suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são essenciais nos cuidados com a saúde humana e animal, porém, promovem pressão seletiva na população bacteriana, fortalecendo o surgimento de cepas resistentes. Cepas de *Salmonella* spp com resistência a múltiplos agentes antimicrobianos podem ser encontradas no ambiente aquático como resultado do maior ou menor grau de impacto por atividades humanas. O surgimento de cepas com resistência a agentes microbianos é um problema relacionado à saúde pública, sendo de relevância e significado epidemiológico mundial (FAO/OIE/WHO, 2003/ 2006).

Existe um crescente número de sorotipos de Salmonelas resistentes aos agentes antimicrobianos, estando associados principalmente ao sorotipo *S. Typhimurium* (*definitive type*) DT104 e com a resistência as quinolonas (Ciprofloxacina) e outros antimicrobianos comumente empregados em ambientes avícolas e criatórios em todo o mundo. A cepa MR (*multiresistant*) DT104 de *S. Typhimurium*, não comum no Brasil (TÉO e OLIVEIRA, 2005), é a principal causa de salmonelose de origem alimentar e hídrica, nos países europeus e norte americano, apresentando múltipla resistência (8 a 16 agentes antimicrobianos diferentes) (KIM and AOKI, 1994; ÂNGULO et al., 2000; NASTASI and MARMINA, 2001; HELMS et al.,

2002; DOUBLET et al., 2003; ZHAO et al., 2003; MARTINEZ-UTARZA et al., 2004 [A, B]; HSUEH et al., 2004; VARMA et al., 2005; POLITI et al., 2005).

Caracterização dos Principais Sorogrupos A-D1, B e C2-C3 do Gênero *Salmonella*

O lipopolíssacarídeo (LPS) é um dos maiores determinantes de virulência na maioria das bactérias Gram-negativas (LINDBERG, 1980). *Salmonella*, assim como a maioria dos patógenos invasores (*Legionella*, *Mycobacterium*, *Yersinia*), são internalizados ou fagocitados por estruturas ligadas a membrana interna da célula hospedeira, permanecendo encapsulados por elas por tempo indeterminado. Os fatores de virulência que permitem estes microrganismos resistirem à fagocitose celular, aumentando o tempo de sobrevivência intracelular, especialmente nos fagócitos, incluem a cápsula bacteriana e o LPS, os quais formam uma capa protetora ao redor da célula bacteriana (FINLAY and FALKOW, 1997).

A estrutura química do LPS de *Salmonella* é composta de três regiões distintas: a cadeia do polissacarídeo O; o domínio de ligação (*core*) oligossacarídico; e o lipídio A (LÜDERITZ et al., 1966). Esta última região, é a responsável por ancorar a molécula inteira do LPS na membrana externa do envelope bacteriano e é altamente conservada em alguns gêneros bacterianos, e o domínio de ligação do oligossacarídeo possui uma única variação em todas as espécies de *Salmonella* estudadas até então (TSANG et al., 1991). As cadeias do polissacarídeo O são formadas pela polimerização de unidades repetitivas contendo de três a seis açúcares para os sorogrupos A a E de *Salmonella* e são antigenicamente variáveis. Tais variações antigênicas na estrutura da cadeia O serviram de fundamento para a classificação sorológica do gênero *Salmonella* (KAUFFMANN, 1972; LINDBERG and LE MINOR, 1984).

Estudos da imunoquímica do antígeno O de *Salmonella* evidenciaram que a presença de uma molécula de 3,6-dideoxi-hexose se quebrava e derivava um açúcar específico para os sorogrupos A (paratose), B e C2 (abequose) e D (tivelose), gerando um importante parâmetro para determinar a especificidade do antígeno somático O nestes microrganismos (LINDBERG et al., 1983).

Com a possibilidade do uso de novas tecnologias em biologia molecular, SANDERSON E ROTH (1988) localizaram o agrupamento genético *rfb* ligados ao operon *his* no cromossomo de *Salmonella enterica*, codificando glicosil-sintetase e outras enzimas necessárias para a biosíntese das unidades de repetição do oligossacarídeo (MÄKELA et al., 1984; NIKAIDO et al., 1966).

Em 1993, percebendo a oportunidade única da criação de sondas sorogrupo específicas através do agrupamento genético *rfb*, LUK et al., utilizaram as sutis diferenças observadas na síntese final dos açúcares dos sorogrupos A, B, C2 e D (Figura 1), para obter seqüências de nucleotídeos que selecionassem e diferenciasssem os principais sorogrupos patogênicos de *Salmonella enterica*.

Figura 1: A) alinhamento das regiões *rfb* dos sorogrupos de *S. enterica* E1, D, A, B e C2; B) via da síntese dos açúcares da dideoxi-hexose, indicando os genes que codificam enzimas que catalisam a síntese de carboidratos dos sorovares que são expressos como um resultado de vários carboidratos sintetizados (LUK et al., 1993).

Recentemente, com o seqüenciamento genético, foi possível descobrir o agrupamento específico para o sorogrupo C1. Através deste seqüenciamento foi possível identificar homologia entre os genes do agrupamento *rfb* do sorogrupo C1 e *wzx*, gene codificador do açúcar flipase do antígeno O de *Escherichia coli*, descoberto em *S. enterica* Sundsvall e Carrau (WANG et al., 1998; FITZGERALD et al., 2003).

IV – QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE ÁREAS PORTUÁRIAS BRASILEIRAS¹

As regiões portuárias inserem-se no contexto paisagístico dos ambientes costeiros, cercados por cidades que se estendem na área do seu entorno. Desta forma, diversas atividades antrópicas causam impactos à biodiversidade e à qualidade dos ecossistemas aquáticos, de maneira direta ou indireta, tornando a utilização dos recursos hídricos comprometida, aumentando o risco de doenças de transmissão hídrica e prejudicando a saúde ambiental (FORSHELL and WIERUP, 2006).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 80% das doenças nos países em desenvolvimento são ocasionadas por transmissão hídrica (WHO, 2006).

A globalização ocasionou o crescimento do transporte de produtos alimentícios e outros bens de consumo, principalmente via marítima (SAKER et al., 2006), contribuindo para o aumento de problemas ambientais que incluem a pesca predatória, poluição química, eutrofização, alteração do habitat físico, introdução de espécies exóticas e o possível transporte de microrganismos patogênicos devido ao deslastre da água dos navios em regiões portuárias e a queima dos combustíveis fósseis, que levaram ao aquecimento global, elevando a temperatura das águas oceânicas (NRC, 1996; 1999).

Estima-se que atualmente, a movimentação do comércio de bens realizada por via marítima seja da ordem de 96% em nível nacional e de 80% em nível mundial (RT/ANVISA, 2004). Uma vez que os navios utilizam a água dos portos onde estão ancorados para carregarem seus tanques de lastro, dependendo da

¹ A coleção institucional do Ministério da Saúde utilizada como referência neste estudo pode ser acessada em: www.saude.gov.br/bvs.

qualidade microbiológica destas águas, existe a possibilidade de transporte de bactérias patogênicas para outras áreas portuárias.

A distribuição dos microrganismos em águas oceânicas depende de fatores como as correntes marítimas, mas é influenciado principalmente pelas atividades antrópicas. A principal via de exposição do homem aos microrganismos presentes neste ambiente é pela ingestão de alimentos de origem marinha, entretanto, doenças infecciosas também podem ocorrer eventualmente pelo contato primário, recreacional ou ocupacional destas águas (NCR, 1999).

Os moluscos bivalves são considerados “sentinelas” do ambiente marinho, pois para atender suas necessidades nutricionais, concentram o plâncton filtrando até cinco litros de água por hora, concentrando também os microrganismos presentes no ambiente aquático (WOOD, 1979; LOPES et al., 1979). A densidade de microrganismos concentrados nos bivalves reflete a qualidade microbiológica da água onde se desenvolvem e, por esta razão, são utilizados como modelo de estudo da poluição fecal de determinado ambiente marinho ou estuarino.

As águas de uso recreacional são avaliadas constantemente, entretanto, dados concernentes à qualidade microbiológica da água de áreas portuárias em todo o mundo são escassos (JOACHIMSTHAL et al., 2003).

Esta tese fez parte do projeto intitulado “Diagnóstico Microbiológico de Áreas de Risco em Portos Brasileiros Selecionados” e que foi pioneiro no Brasil. O projeto foi realizado em 2002 e 2003, sob coordenação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Dados concernentes às áreas portuárias selecionadas também são apresentados.

PORTO DE BELÉM/PA

O Porto de Belém foi inaugurado em 1909 e está situado a uma distância de 120 Km do oceano Atlântico, na margem direita da baía de Guajará, formada pelos rios Moju, Guamá, Acará e Pará. É um porto abrigado, praticamente isento de ventos fortes. Na margem esquerda dessa baía se localiza a ilha das Onças com 19 Km de comprimento e uma série de ilhas menores.

O porto possui instalações terrestres na margem direita da baía de Guajará, estendendo-se do mercado Ver-o-Peso até o riacho Burrinhos, compondo cais, docas, pontes e píeres de atracação e acostagem, armazéns, edificações em geral e vias internas de circulação rodoviária e ferroviária e ainda os terrenos ao longo dessas áreas e em suas adjacências pertencentes à União. A região em que o porto de Belém se situa possui temperatura média de 25,7° C e pluviosidade de 2.800 mm e em 2000, foram movimentadas 13.956.665 ton de cargas pelo porto.

PORTO FORTALEZA/CE

O porto situa-se na enseada de Mucuripe, na cidade de Fortaleza, capital do estado do Ceará, sendo um porto artificial, o acesso ao cais de atracação é feito por canal com cerca de 1.200 m de comprimento por 100 de largura e retilíneo. A área do porto organizado é constituída por instalações portuárias terrestres e marítimas delimitadas por poligonais de carta marítima. A velocidade dos ventos é de aproximadamente 1,2 m/s, sendo predominantemente intensa no segundo semestre, nos meses de agosto, setembro e outubro, as marés atingem nível médio de 1,55 m. Conta com um cais comercial destinado a pequenas embarcações. Dispõe de cinco armazéns e de pátios a céu aberto para contêineres, para minérios, para exportação e um píer destinado à movimentação de petróleo e derivados. Em 2000 foram movimentadas 3.632.385 toneladas em cargas.

PORTO DE ITAGUAÍ/RJ

Encontra-se na costa norte da baía de Sepetiba, no município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, ao sul e a leste da Ilha da Madeira. A área organizada do porto Itaguaí é constituída pelas instalações portuárias terrestres existentes na baía de Sepetiba, delimitadas pela poligonal definida pelos vértices de coordenadas geográficas abrangendo todos os cais, docas, pontes e píeres de atracação e de acostagem, armazéns, edificações em geral e vias internas de circulação rodoviária e ferroviária e ainda os terrenos ao longo dessas áreas e em suas adjacências pertencentes à União, incorporados ou não ao patrimônio do porto de Sepetiba ou sob sua guarda e responsabilidade; em 2000, o porto Itaguaí movimentou 39.830.861 ton de cargas, sendo no cais publico 15.763.205 ton e fora do cais 24.067.656 ton correspondendo a 98,7% aos granéis sólidos.

PORTO DE PARANAGUÁ/PR

Situado no litoral paranaense, na cidade de Paranaguá, à margem sul da baía de Paranaguá, sua jurisdição se estende até o litoral norte do Estado divisa com o Estado de São Paulo, até a foz do rio Saí-Guaçú, na divisa com o Estado de Santa Catarina. A área do porto é constituída por pelas instalações portuárias terrestres existentes na baía de Paranaguá, desde o Pontal do Sul, estendendo-se até a foz do rio Nhundiaquara. Abrangendo todos os cais, docas, pontes e píeres de atracação e de acostagem, armazéns, silos, rampas ro-ro, pátios, edificações em geral, vias internas de circulação rodoviária e ferroviária e ainda os terrenos e ilhas ao longo dessas faixas marginais e em suas adjacências pertencentes à União. Possui cais comercial com extensão acostável de 2.616 m que permite atracação simultânea de 12 a 14 navios desde os pequenos de cabotagem até os supergraneleiros de 270 m de comprimento. Também possui um cais de inflamáveis, separado do cais comercial, compreendendo dois “píeres”, um com 143 m e o outro com 184 m. Em 2000 o porto Paranaguá movimentou no cais publico 21.107.518 ton de cargas. Em 2002 foram atendidos 2.050 navios e movimentadas 28.518.549 ton de cargas, sendo 68,4% de granéis sólidos.

PORTO DE RECIFE/PE

Localizado na parte centro-leste da cidade de Recife, capital do estado de Pernambuco, na confluência e às margens dos rios Capibaribe, ao sul, e Beberibe, no local onde deságua no oceano Atlântico. Organizado em instalações portuárias terrestres existentes na cidade de Recife, tendo como limites extremos o molhe de Olinda, ao norte, e a ponte Agamenon Magalhães, ao sul, na Baía do Pina, abrangendo todos os cais, docas, pontes e píeres de atracação e de acostagem, armazéns, edificações em geral e vias internas de circulação rodoviária e ferroviária e ainda os terrenos ao longo dessas áreas e em suas adjacências pertencentes à União. Dispõe de 13 armazéns de carga geral (internos) e três armazéns de carga geral (externos). Temperatura média de 25,6° C, chuvas (media anual) 2272,9 mm; altura media da maré: 1,12m. No cais publico do Porto Recife, em 2000 movimentou 2.356.723 ton de cargas (trigo, adubo, cevada, açúcar e derivados de petróleo).

PORTO RIO GRANDE/RS

Localizado na margem direita do canal do norte, ligando a Lagoa dos Patos ao oceano Atlântico. Compreende os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, o Uruguai, o sul do Paraguai e o norte da Argentina. A área portuária, inclui o Porto Velho, o Porto Novo e a Quarta Seção da Barra, abrangendo todos os cais, docas, píeres, armazéns, pátios, edificações em geral, vias internas de circulação rodoviária e ferroviária, os terrenos ao longo dessas faixas marginais e em suas adjacências. Com temperatura média de 18° C e pluviometria de 112 dias/ano distribuídos por 12 meses. No ano de 2000, o porto Rio Grande movimentou 13.872.474 ton de cargas, sendo que 13.805.097 ton no cais e 67.377 ton fora do cais, que representaram respectivamente 99% e 1% do total do porto.

PORTO DE SANTOS/SP

O porto está localizado no centro do litoral do estado de São Paulo, estendendo-se ao longo da região estuarina limitado pelas ilhas de São Vicente e Santo Amaro, situado a 2 Km do oceano Atlântico. A área do porto organizado é constituída por instalações portuárias terrestres, existentes na margem direita do estuário formado pelas ilhas de São Vicente e de Santo Amaro, desde a Ponta da Praia até a Alamoia e, na margem esquerda, desde a ilha de Barnabé até a embocadura do rio Santo Amaro, abrangendo todos os cais, docas, pontes, píeres de atracação e de acostagem, armazéns, pátios, edificações em geral, vias internas de circulação rodoviária e ferroviária e, ainda, os terrenos ao longo dessas faixas marginais e em suas adjacências, pertencentes à União, sob sua guarda e responsabilidade, incluindo-se também a Usina Hidrelétrica de Itatinga e a faixa de domínio de suas linhas de transmissão. O porto possui uma área total de 7,7 milhões de m², com 54 berços pertencentes à CODESP (11.600 m) e 10 privativos (1.413 m) variando o calado de 5,0 a 13,5 m. Temperatura média: 20° C; chuvas em 300 mm; altura média de maré alta: 1,7 m; Altura da média maré baixa: 0,5 m. Em 2000 foram movimentadas cargas no cais publico na ordem de 31.042.652 ton e, fora do cais, 12.041.731 ton, que responderam, respectivamente, por 72% e 28% do total do porto, 43.084.383 ton. Em 2004 foram atendidos 1.976 navios, movimentando 26.960.695 ton (soja em grãos, açúcar, óleo, combustível, adubo e trigo).

SAÚDE DA POPULAÇÃO E SAÚDE AMBIENTAL DAS ÁREAS SELECIONADAS

Dados sobre a saúde da população e do ambiente referentes às regiões portuárias brasileiras selecionadas neste estudo foram apresentados neste tópico (CGVAM/SVS/MS, 2006), com a finalidade de sustentar a importância na vigilância epidemiológica e da ecologia de *Salmonella* spp e associando seu isolamento no ecossistema aquático com o nível de impacto antrópico e o risco direto para saúde pública.

Avaliando-se os índices de maior relevância, observa-se que a distribuição de renda nos Estados do Norte e Nordeste do país é menor do que nas regiões Sul e Sudeste, de acordo com, o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). A taxa de urbanização também é maior nas regiões Sudeste e Sul (CGVAM/SVS/MS, 2006). As diferenças entre as porcentagens dos Censos Demográficos de 1991 e 2002 (IBGE), apontam taxa de crescimento maior na região Norte do país em relação às demais. O país possui um índice de desenvolvimento humano (IDH) médio (PNUD, 2000). A tabela 2 apresenta a porcentagem da população nas áreas selecionadas que possui algum tipo de instalação sanitária.

Dentre as informações fornecidas ao Ministério da Saúde pela coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental, as regiões Sudeste e Sul são as que possuem a maior taxa de adequação de moradia, abastecimento e escoamento sanitário tratado, coleta de lixo e investimentos em programas de saneamento básico. Um reflexo desta situação, é verificado pela taxa de morbidade e mortalidade por doença diarreica aguda (DDA) em indivíduos adultos e em menores de 5 anos. Em 2004, nas regiões Norte e Nordeste, a morbidade por DDA acometeu 499 e 702/100.000 habitantes, respectivamente, enquanto que nas regiões Sudeste e Sul foram 198 e 281/100.000 habitantes, respectivamente. O índice de mortalidade em menores de cinco anos, acometidos por DDA de transmissão hídrica, foi de 4,83% na região Norte, 6,53% na região Nordeste, 2,21% na Sudeste e 2,30% na região Sul (CGVAM/SVS/MS, 2006).

De acordo a avaliação dos indicadores de qualidade da Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde, o Estado de Pará foi classificado como ruim e o Estado de Ceará como regular, assim como o Estado do Rio de Janeiro e o Estado de Rio Grande do Sul foi classificado como bom (FUNASA, 2001).

Tabela 2. Porcentagem de moradores por tipo de instalação sanitária em, 2000 em Belém (PA), Fortaleza (CE), Recife (PE), Rio de Janeiro (RJ), Santos (SP), Paranaguá (PR) e Rio Grande do Sul (RS).

Fonte: IBGE/Censos Demográficos

Tipo de Instalação Sanitária	Belém	Fortaleza	Recife	Rio de Janeiro	Santos	Paranaguá	Rio Grande do Sul
Rede geral ou esgoto pluvial	24,6	43,5	41,1	76,3	92,9	69,1	47,1
Fossa séptica	49,9	19,2	15,3	16,7	0,9	14,1	43,9
Fossa rudimendar	10,7	30,9	32,9	1,4	0,4	6,1	3,5
Vala	8,2	1,2	2,5	3	1,9	1,5	3,7
Rio, lago ou mar	1,5	1,4	4,6	1,8	3,6	7,1	0,4
Outro escoadouro	1,2	0,8	1	0,3	0,1	0,3	0,4
Não tem instalação sanitária	3,9	3,2	2,6	0,5	0,1	1,8	1,1

O presente estudo visou caracterizar o perigo microbiológico pela presença de *Salmonella* spp. em áreas portuárias brasileiras com diferentes níveis de atividade antrópica na área de seu entorno e a possibilidade do seu transporte via tanques de lastro, afetando áreas de cultivo de moluscos bivalves, pesca ou recreação, colocando em risco a saúde pública.

OBJETIVOS

- Caracterizar a prevalência dos sorovares de *Salmonella* spp. em ambientes aquáticos da área do entorno de sete portos brasileiros (Santos/SP; Recife/PE; Itaguaí/RJ; Fortaleza/CE; Paranaguá /PR, Belém/PA e Rio Grande/RS).
- Estudar a frequência dos sorovares isolados em moluscos bivalves coletados em locais próximos às regiões portuárias.
- Verificar a frequência de resistência a diferentes agentes antimicrobianos comumente usados na terapia das salmoneloses animais e humanas.
- Relacionar coliformes termotolerantes (CT_T) e Enterococos fecais (EF) com a presença de espécies do gênero *Salmonella* em amostras de água.
- Relacionar a qualidade microbiológica encontrada em moluscos bivalves com a água do entorno de bancos naturais onde foram coletados.
- Comparar a caracterização sorológica convencional com o uso de ferramenta molecular na identificação dos sorovares e sorogrupos de *Salmonella* spp
- Utilização pela técnica de PCR, utilizando o agrupamento *rfb* na identificação dos grupos de *Salmonella* spp, para que possa ser utilizado em programas de Vigilância Epidemiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi realizado entre 2002 e 2003 sob coordenação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Considerando levantamento prévio realizado pela Gerencia de Vigilância Sanitária de Portos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ ANVISA através de questionário para identificação das áreas portuárias impactadas, critérios de seleção das regiões portuárias participantes deste estudo de acordo com as respostas obtidas, podem ser observados no item a seguir:

1. Seleção de Portos

As amostras foram coletadas em seis pontos dentro das seguintes regiões portuárias brasileiras: Belém (PA); Santos (SP); Recife (PE); Itaguaí (RJ); Fortaleza (CE) Paranaguá (PR) e Rio Grande (RS). A seleção destes portos foi realizada após análise de respostas enviadas pelas respectivas gerencias portuárias de cada região participante mediante ao seguinte questionário:

- 1- O deslastramento atinge áreas costeiras do porto e/ou de banhistas e/ou cultivo de produtos marinhos?
- 2- Existe controle microbiológico das águas na região costeira do porto e/ou das regiões utilizadas por banhistas?
- 3- O esgoto da região é totalmente tratado? Em que percentagem? Ele é jogado no mar ou no porto? É possível determinar os pontos onde existe lançamento de esgoto *in natura* ou esgoto tratado (próprio da região) na área do porto?
- 4- Existe hábito de consumo de moluscos bivalves em sua região? Quais? São consumidos “in natura”?

Com relação à área de abrangência do deslastramento de navios nas áreas costeiras do porto, Belém, Rio Grande e Fortaleza afirmaram áreas próximas a banho e recreação em seus portos, apenas não atingindo áreas de pesca e de cultivo no porto de Santos. O porto de Recife respondeu não ter projeto para avaliar o risco de áreas portuárias afetadas durante o deslastre e o porto de Sepetiba

informou que o deslastre não atinge região costeira, recreacional ou de pesca e cultivo de alimentos marinhos.

Os Estados dos respectivos portos responderam que o controle microbiológico da água é realizado apenas nas praias freqüentadas por banhistas, periodicamente pelos respectivos órgãos de competência existentes em cada Estado.

Quando questionados com relação à existência de pontos de lançamento de esgoto “in natura” ou com algum tipo de tratamento antes de ser lançado na região do porto e qual a porcentagem de esgoto tratado antes do seu lançamento, Recife, Rio Grande, Fortaleza e Santos comunicaram que o esgoto era tratado na porcentagem de 20 a 40% antes do seu lançamento em corpos de água, e Santos tem controle do esgoto lançado “in natura” na região do porto via emissário submarino totalmente controlado pela Companhia de Tecnologia em Saúde Ambiental (CETESB). Apenas, os portos de Itaguaí e Belém, informaram lançar o esgoto sem tratamento prévio diretamente em suas águas.

Apenas as regiões portuárias de Itaguaí e Fortaleza, responderam não possuir hábito do consumo de qualquer espécime de molusco bivalve “in natura”, em suas regiões. Apesar do porto Belém, afirmar o hábito, o local não participou das campanhas para avaliar a qualidade e o risco de consumo dos espécimes “in natura”.

1.2. Pontos de Coleta

Os locais de coleta foram definidos após uma vistoria terrestre (parque portuário) e marítimo-fluvial tentando obter dados pertinentes ao grau de saneamento da região portuária. Foram considerados seis pontos de coleta ao longo de cada porto de acordo com a presença de lançamentos de esgotos sem tratamento prévio na área do porto, atividade de pesca nas regiões adjacentes, fábricas, terminais de passageiros, definindo áreas de baixo, médio e alto fator de impacto antrópico.

2. Coleta de Amostras

2.1. Água

As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis com capacidade para 5.000 mL (5 L). Posteriormente a coleta os frascos foram acondicionados em caixas especiais para transporte a 4 °C e processadas até 24 horas. A análise dos parâmetros físico-químicos da água coletada foi medida “in loco” com auxílio de um aparelho multi-parâmetros (Hach) e o pH registrado por fita (Merck). Foram registrados dados de temperatura, salinidade, pH, condutividade e turbidez. Os dados de temperatura da água e o pH foram registrados no momento da coleta. As demais variáveis foram medidas no laboratório.

3. Análise Microbiológica das Amostras de Água

3.1. Contagem de Coliformes Tertotolerantes (CT_T)

Para a contagem de CT_T em amostras da água, foi utilizada metodologia descrita por APHA, 1998. Foram filtrados volumes entre 10 mL e 100 mL em membrana 0,45 µm de porosidade (Millipore, Billerica, MA, USA) sendo concentrados pela técnica de membrana filtrante (MF). A membrana foi colocada em placa contendo Agar mFC (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ/USA) e incubada em banho-maria à temperatura de 44,5° C durante 24 horas. Após este período, o crescimento de colônias de cores rosa e azul na superfície da membrana foi então contado e as colônias azuis foram inoculadas em Agar EMB (Eosina Azul de Metileno) [OXOID]. O resultado das contagens dos crescimentos obtidos nas placas de Agar mFC foi expresso em UFC (unidades formadoras de colônias)/ 100 mL (STANDARD METHODS, 1992; APHA, 1998).

3.2. Contagem de Enterococos fecais (EF)

Para contagem de EF, a metodologia utilizada foi a técnica de membrana filtrante (STANDARD METHODS, 1992), como indicadores de balneabilidade da água. Alíquotas de 10 e 100 mL da amostra de água foram concentradas através de filtração em membrana com 0,45 μm de porosidade (Millipore, Billerica, MA, USA), após o procedimento a membrana foi colocada na superfície de uma placa contendo Agar ME (Difco) e incubada em estufa à temperatura de $41, 5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por período de 48 horas. Após este período, colônia com coloração vermelha – escuras bem isoladas crescidas na superfície da membrana, foram submetidas para confirmação da espécie *Enterococos*, utilizando-se ensaios de halotolerância, inoculando colônias características em caldo BHI (Difco) acrescido de 6,5% de NaCl, incubado à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 48 horas, termoresistência inoculando em BHI sem NaCl incubado à $41, 5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e Agar Bile e Esculina (Difco), para verificação da hidrólise da esculina, à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Os três meios permaneceram incubados em suas respectivas temperaturas por um período de 48 horas. As colônias vermelhas – escuras que apresentavam crescimento nos três meios especificados confirmavam-se positivas para presença de *Enterococos* em água. Além destas provas, foi feito ainda coloração de usando bateria de Gram e prova de catalase pelo uso de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Merck).

3.3. Pesquisa de *Salmonella* spp

Para pesquisa de *Salmonella* spp em amostras de água selecionou-se metodologia descrita dentro dos parâmetros para isolamento do gênero *Salmonella* em diversos ambientes aquáticos descritos por Martins (1979). Os meios de cultura foram selecionados de acordo com prescrição feita pelo AOAC (1995), FDA (1998), Standard Methods (1992).

De acordo com Martins, 1979 o maior número de células de *Salmonella* encontradas ocorreu ao serem filtrados 2.000 mL. Padronizando, então, coleta e filtração para 2 L, que foram concentrados por membrana de nitrocelulose com 0,45 μm de porosidade (Millipore com 147 mm de diâmetro) para pesquisa do gênero.

Após filtração, as seguintes etapas foram realizadas para pesquisa de *Salmonella* spp: pré-enriquecimento Água Peptonada Tamponada 1% pH 7,2

(APT1%) (Difco); enriquecimento seletivo (caldo Selenito-Cistina [SC] e caldo Rappaport-Vassiliadis [RV]) (Difco), incubado em estufa a 41,5° C por 48 horas. E, posteriormente, crescimento seletivo em meios específicos [Agar Verde Brilhante (VB), Agar Bismuto-Sulfito (BSA), Agar Hektoen Enterico (HEK) e Agar Xilose Lisina Dextrose (XLD)] (Difco) por 24 horas a 37° C. Foram selecionadas de 1 a 10 colônias com morfologia característica de *Salmonella* de cada um dos meios seletivos utilizados, repicadas em Agar Gelose de Conservação como descrito por Flowers et al. (1992) e seguiu-se caracterização bioquímico-sorológica das colônias isoladas em IAL (PESSOA & SILVA, 1972) e antissoros policlonais somático O e flagelar H (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil) para confirmação sorológica presuntiva (FLOWERS et al., 1992; ANDREWS et al., 1995).

4. Análise microbiológica de Moluscos Bivalves

4.1. Seleção dos locais de coleta de amostras de moluscos bivalves

As regiões do entorno portuário selecionadas para esta campanha foram realizadas, principalmente com relação ao hábito do extrativismo e consumo humano de moluscos bivalves “in natura” e de quais espécimes foram comumente mais consumidos nestas regiões, mediante respostas obtidas pelo questionário veiculado pela Gerencia Geral de Portos, Aeroportos e Fronteiras. Foram selecionadas áreas circundantes a seis portos brasileiros nos períodos de Setembro e Outubro de 2002 e Fevereiro, Março e Abril de 2003 para as coletas de moluscos bivalves: Fortaleza/CE, Sepetiba/RJ, Rio Grande/RS, Recife/PE, Santos/SP e Paranaguá/PR. e o resultado obtido expresso por Número mais Provável (NMP) seguindo o Standard Methods, 1992.

4.2. Coleta

Cada amostra de bivalve incluía aproximadamente 30 unidades. Os bivalves coletados nas regiões próximas aos portos, não faziam parte de fazendas destinadas a malacocultura, sendo obtidos através do extrativismo local e selecionados pelo hábito de seu consumo “in natura” nas regiões onde ocorreram as amostragens. Posteriormente à coleta, as amostras foram acondicionadas para

transporte em redes de feira estéreis. Colocadas em caixas para transporte com refrigeração e processadas num prazo de 24 horas.

4.3. Tratamento das Amostras

A superfície externa das valvas foi lavada com água corrente potável e escova para a remoção de resíduos aderidos. Os tecidos moles e o líquido intravalvar de aproximadamente 20 bivalves de cada área portuária foram coletados dentro da câmara de fluxo laminar com auxílio de um abridor de ostras. Cada amostra foi homogeneizada em Stomacher (Medical Seward) por 60 segundos. Seguindo metodologia descrita pela American Public Health Association (APHA, 1985) e AOAC (1995).

4.4. Identificação dos espécimes coletados

As valvas restantes da análise foram enviadas para identificação da espécie pelo Prof. Dr. Flávio Fernandes do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira [IEAPM], em Arraial do Cabo, RJ, órgão pertencente à Marinha do Brasil.

4.5. Análise Microbiológica das Amostras de Molusco Bivalve

4.5.1. Contagem de Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (CT_T).

Foi utilizada a técnica de número mais provável (NMP) em tubos múltiplos (STANDARD METHODS, 1992). Em cada amostra, 25 gramas do homogeneizado em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) a 1% (Difco) foram feitas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Alíquotas de 1 mL foram transferidas de cada diluição, em triplicata, para tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (Difco) e incubados a 35° C por 24-48 horas. A partir dos tubos com formação de gás, foram repicadas três alçadas de cada amostra em caldo EC (Difco) e incubadas a 44,5° C $\pm$ 0,2 por 24 - 48 horas em banho-maria. Após este período, os tubos que apresentassem produção de gás foram semeados em Agar EMB (OXOID) (APHA, 1998).

4.5.2. Pesquisa de *Salmonella* spp. em Amostras de Molusco Bivalve

Foi realizada de acordo com metodologia descrita por Flowers et al., 1992 e Andrews et al., 1995. 25 gramas do conteúdo intravalvar foi homogeneizado em 225 mL de APT 1% por Stomacher por 60 segundos, e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente, o pH do APT foi medido (Merck), ajustado (5,5-7,5) e incubado a 35 °C por 24 horas. Os processos de enriquecimento seletivo, isolamento, identificação bioquímico-sorológica foram feitos como descritos para as cepas características isoladas em amostras de água. Assim como para as cepas de origem aquática, foram selecionadas de 1 a 10 colônias com morfologia característica de *Salmonella* de cada um dos meios seletivos usados para o isolamento, que foram repicadas em Agar Gelose de Conservação (FDA, 1995) e seguindo a caracterização bioquímico-sorológica presuntiva das colônias isoladas em EPM/ MiLi e IAL e antissoros policlonais somático O e flagelar H (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil).

5. Ensaio de suscetibilidade frente a agentes antimicrobianos

O ensaio de suscetibilidade frente a agentes antimicrobianos para as 214 cepas de *Salmonella* spp identificadas em água e molusco bivalve seguiu metodologia descrita por Bauer and Kirby (1966). Utilizando método de disco difusão em placa, o numero de agentes antimicrobianos, espectro de atuação e os níveis de resistência tiveram como referência o manual NCCLS (2005).

5.1. Antibióticos Selecionados

Foram utilizados discos da marca Cecon (Sensifar®), contendo os seguintes agentes antimicrobianos impregnados nas seguintes concentrações: CTX (cefotaxima) 30 µg/mL; AMP (ampicilina) 10 µg/mL; CRX (cefuroxima) 30 µg/mL; KAN (kanamicina) 30 µg/mL; AMI (amicacina) 30 µg/mL; CIP (ciprofloxacina) 5 µg/mL; PPT (piperacilina+tazobactam) 110 µg/mL; AMC (ácido clavulâmico+amoxicilina) 30 µg/mL; CAZ (ceftazidima) 30 µg/mL; ATM (aztreonam) 30 µg/mL; SUT (cotrimoxazol ou sulfatrin) 25 µg/mL; CLO (cloranfenicol) 30 µg/mL;

FLF (florfenicol) 30 µg/mL; GEN (gentamicina) 10 µg/mL. A interpretação dos halos de inibição foi feita de acordo com padrão descrito no manual NCCLS (2005).

5.2. Preparo do Inóculo

As culturas inoculadas em caldo Luria Bertani (Difco) e incubadas a 35° C por 18 horas, a partir do crescimento, com auxílio de pipeta Pasteur, uma gota foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril, que foi imediatamente vertido em placa contendo Agar Müeller-Hinton (Difco), previamente seca, através de movimentos horizontais da placa em várias direções, espalhando o inóculo uniformemente pela superfície do Agar. Após cerca de 1 minuto os discos dos respectivos agentes antimicrobianos foram colocados na superfície do meio e as placas incubadas em estufa à 35° C por 18 até 24 horas. Após este período, procedeu-se a leitura do ensaio de resistência como descrito no item 4.1.

A cepa padrão *S. Typhimurium* (IAL 1434/Koch 6643), adquirida na seção de culturas do Instituto Adolfo Lutz/SP, foi utilizada como controle de qualidade do ensaio do padrão de resistência frente a agentes antimicrobianos, que manteve o seguinte padrão de resistência em todos os ensaios realizados: CTX (cefotaxima) 30 µg/mL; AMP (ampicilina) 10 µg/mL; CRX (cefuroxima) 30 µg/mL; KAN (kanamicina) 30 µg/mL; AMI (amicacina) 30 µg/mL; CIP (ciprofloxacina) 5 µg/mL; CLO (cloranfenicol) 30 µg/mL; FLF (florfenicol) 30 µg/mL; GEN (gentamicina) 10 µg/mL.

6. Sorologia Confirmativa pelo Esquema de Kauffmann-White e Caracterização Sorológica Molecular dos sorogrupos e sorotipos identificados de *Salmonella* spp em amostras de água do mar e molusco bivalve

6.1. Sorotipagem dos isolados de *Salmonella* spp

Foi realizado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo com a colaboração da Seção de Bacteriologia, adotando-se a técnica da soroaglutinação rápida com antissoros policlonais somático e flagelar, polivalentes e de fatores puros segundo Popoff, 2001.

6.2. Caracterização sorológica molecular dos sorogrupos

6.2.1. Extração de DNA

Foi realizada seguindo protocolo descrito por fabricante do kit Wizard® Genomic DNA Purification Promega (Promega Road-Madson, WI). O sobrenadante do extrato bacteriano contendo DNA genômico foi diluído em aproximadamente 50-100µL de Solução de Ridratação [10mM Tris-HCl [pH7.4]/ 1mM EDTA(pH8.0)] Wizard® Genomic DNA Purification.

6.2.2. Qualidade e concentração de gDNA

A qualidade foi verificada através de corrida em gel de Agarose 0.8%, 5V/cm (100V) por 30 minutos, como também, as preparações de DNA foram medidas por espectrofotometria utilizando aparelho **GeneQuant II®** (Pharmacia Biotech, Cambridge, England), em um comprimento de onda U.V. a 260nm. A medida de ratio padronizada, entre 260-280 nm, foi de 1.7 a 2.0.

6.2.3. Caracterização molecular usando agrupamento genético *rfb* pela técnica de uniplex PCR

Foi realizada conforme descrita por LUK *ET AL.*,1993 com algumas modificações usando oligonucleotídeos desenhados para os grupos B, C2-C3 e A-D1. Os iniciadores ('primers') utilizados estão descritos a seguir:

Seqüências de Oligonucleotídeos	Fragmentos esperados em pares de base [pb] de acordo com descrito por Luk <i>et al.</i> 1993
<i>rfbS</i> (A-D1) 5'-TCA CGA CTT ACA TCC TAC-3' <i>rfbS</i> (A-D1) 5'-CTG CTA TAT CAG ACA AAC-3'	~720
<i>rfbJ</i> (C2-C3) 5'-ATG CTT GAT GTG AAT AAG-3' <i>rfbJ</i> (C2-C3) 5'-CTA ATC GAG TCA AGA AAG-3'	~820
<i>rfbJ</i> (B) 5'- AGA ATA TGT AAT TGT CAG-3' <i>rfbJ</i> (B) 5'- TAA CCG TTT CAG TAG TTC-3'	~882

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pelo IDT, através de pedido ao representante brasileiro Prodimol. As seqüências foram colocadas no programa BLAST hospedado no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov, para assegurar procedência e especificidade das seqüências testadas, e para avaliar a sensibilidade da técnica 100 ng/ µL DNA total extraído de *Shigella flexneri*; *S. Infantis*; *E. coli* **ATCC 25922**; *E. coli* O157:H7 (IAL); *S. Typhimurium* IAL 1438; *Salmonella* spp. (IAL); *S. Enteritidis* [FMVZ-USP], existentes em nosso laboratório foram submetidos às mesmas condições das reações realizadas com controles positivos para cada grupo descrito no **item 5.2.4**.

Em todas as reações foi utilizado como controle positivo específico para cada conjunto de iniciadores de cada grupo específico as seguintes cepas padrão: *S. Typhi* O-901 IAL 1251 grupo A-D1; *S. Newport* IAL 1195 grupo C2-C3 e *S. Typhimurium* IAL-Koch 1434 grupo B, adquiridas no Setor de Cepas Padrões da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz/SP, e como controle negativo água Milli-Q estéril.

Todas as soluções utilizadas para esta técnica estão descritos em Sambrook et al., 1989.

6.2.4. Condições de Amplificação

A reação da PCR foi feita utilizando 100 ng/µL de DNA total, 20 µM de cada um dos conjuntos de iniciadores, individualmente para os grupos, A-D1, C2-C3 e B; 5X Colorless GoTaqTM Reaction Buffer (Promega, Road-Madson, WI); 2,5 mM de oligonucleotídeos (dNTP) (VJR Comercial Ltda. São Paulo); e GoTaq DNA polimerase (5U/µL) para um volume final de 25 µL de reação, que foram submetidas em aparelho termociclador da marca Eppendorf (falta referência do aparelho), acrescentando modificações no ciclo de amplificação que consistiram em temperatura/tempo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e outra de extensão final a 72°C por 5 minutos para cada reação seguiu 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para denaturação, 45°C por 1 minuto de anelamento, e 72°C por 2 minutos para extensão. Em cada reação foram utilizadas duplicatas de controle DNA cepas controles positivos correspondentes aos sorogrupos caracterizados, pelos oligonucleotídeos iniciadores individualmente testados.

6.2.5. Eletroforese

Os fragmentos obtidos para cada um dos conjuntos 'primers' testados por uniplex PCR foram visualizados em gel de Agarose (Amersham Biosciences, Sweden) a 1,5% por corrida de eletroforese, colocando-se aproximadamente 15 µL de uma mistura da reação com tampão de amostra 6X (Anexo I), desenvolvida a 80V, 5 V/cm, durante 1 hora e 30 minutos em Tampão TAE 1 X (Anexo I). A amplificação dos fragmentos de DNA foi visualizada por luz U.V. em transiluminador (Applied Biosystems), após coloração com brometo de etídio 10 mg/mL, seguindo procedimentos padrões. Após parar a reação, o gel foi fotografado em sistema de foto documentação EagleEye. O marcador de peso de peso molecular utilizado foi o Lambda DNA/*Hind* III (VJR).

6.2.6. Tratamento dado aos resultados dos tamanhos gerados dos amplicons obtidos pela técnica de *rfb*PCR

Os fragmentos amplificados foram medidos em relação ao peso molecular utilizando um programa de software de computador denominado PhotoCaptMW Version 10.01 for Windows (VILBER LOURMAT, Marne La Vallee, France/ (<http://www.vilber.com>)).

V. RESULTADOS

No presente estudo, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de água e bivalves coletados em áreas portuárias brasileiras, com o intuito de verificar a presença desse patógeno na água utilizada como lastro de navios e determinar se existe risco para a população que, vivendo nas proximidades dessas áreas, a utilização para atividades recreacionais e também pelo consumo de moluscos bivalves coletados de bancos naturais de proliferação, situados em áreas próximas às áreas portuárias. Os indicadores de contaminação fecal foram avaliados de forma complementar para determinar a qualidade microbiológica da água e dos bivalves.

V.1 - *Salmonella* spp e indicadores de contaminação fecal em amostras de água portuária

Entre os setes portos analisados, foi possível isolar *Salmonella* spp. na água dos portos de Belém, Paranaguá, Recife e Santos.

Na água do porto de Belém foi isolada *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (subespécie I) em cinco dos seis pontos analisados, numa única coleta (Setembro de 2002). A concentração de coliformes termotolerantes (CF) nas amostras foi elevada, variando de 400 a 20.000 UFC/100 mL, demonstrando haver pontos com contaminação fecal recente. A concentração de Enterococos fecais (EF) foi de até 100 UFC/100 mL, confirmando que a contaminação fecal na área não é intermitente, mas sim por tempo prolongado (Tabela 1). Os sorotipos identificados foram S. Saintpaul, S. Sandiego S. Infantis, S. Albany, S. Miami S. Panama, e S. Grupensis (Tabela 3).

O porto de Paranaguá, serviu de análise por um período de três meses, obtendo-se 18 amostras a partir de seis pontos de coleta e cinco amostras foram positivas para *Salmonella* spp. A concentração de CF ficou entre 16 e 920 UFC/100mL, sendo os outros indicadores observados em baixa concentração (Tabela 1). Foram identificados isolados pertencentes à subespécie I e II, sendo verificados oito sorotipos na subespécie I (Tabela 3).

As 24 amostras coletadas no porto de Recife foram obtidas em quatro meses (Setembro de 2002, Fevereiro, Março, Abril de 2003) de coletas e *Salmonella enterica* foi isolada em quatro amostras de água (Tabela 1). A concentração máxima de CF observada foi de 200 UFC/100mL e EF não foram isolados (Tabela 1). Os sorotipos observados foram S. Saintpaul, S. Agona, S. Kedougou e S. Livingstone (Tabela 3).

A área do porto de Santos também serviu de coleta por um período de quatro meses (Outubro de 2002, Fevereiro, Março, Abril de 2003), sendo possível isolar *Salmonella enterica* em quatro amostras dentre as 24 coletadas. A concentração de CF variou de <1 e 410 UFC/100mL entre os pontos analisados, sendo baixa a concentração de EF (Tabela 1). Foram observados três sorotipos: S. Livingstone, S. Saintpaul e S. Yoruba (Tabela 3).

A região dos portos de Fortaleza, Itaguaí e Rio Grande foram analisadas apenas em um mês de coleta (Setembro e Outubro de 2002) e não apresentaram positividade para *Salmonella*. Nos portos de Fortaleza e Rio Grande, a concentração de EF foi baixa, enquanto que os valores máximos observados para CF foram de 200 e 150 UFC/100ml, respectivamente. Já a água do porto de Itaguaí apresentou-se bastante preservada, pois não houve isolamento desses indicadores. A água do porto de Rio Grande apresentou baixa salinidade durante o mês de coleta, apesar de se tratar de um porto marítimo.

De uma forma geral, o sorotipo mais freqüente nas amostras de água foi S. Saintpaul, observado em 25,6% dos isolados de Salmonela (de um total de 203 isolados, uma vez que três não eram tipáveis), estando presente na água de todos os portos. Portanto, quando é feita uma análise por região portuária, outros sorovares são prevalentes na maioria dos portos. No porto de Santos, S. Livingstone foi o sorotipo mais identificado (77,6%), em Recife se observa a ocorrência prevalente de S. Agona (65,5%) e no porto de Belém, os sorovares S. Panamá e S. Albany foram os mais freqüentes (25% cada). Apenas no porto de Paranaguá S. Saintpaul é o mais frequente (30,2%), seguido de S. Anatum (22,9%) (Tabela 3).

Cada um destes sorotipos entéricos está agrupado em uma chave sorológica que os relacionam aos sorogrupos correspondentes para a subespécie *enterica* de *Salmonella*. Observa-se que, nos portos Recife e Belém, a maior prevalência relaciona-se com o grupo O: 4 [B], identificado numa freqüência de 87,5% e 30%

dos isolados, respectivamente. No porto Santos o sorogrupo prevalente foi O: 7 [C1] (77,6%) e em Paranaguá, o sorogrupo O: 4 [B] (38,5%), seguido do sorogrupo O: 3,10 [E1] (35,2%) (Tabela 3). No porto de Paranaguá, houve um isolado de *S. enterica* subespécie *salamae* 42, r: - (Tabela 3), que representa a segunda subespécie da subdivisão do gênero *Salmonella*, mostrando que neste porto houve uma maior diversidade de sorotipos e sorogrupos do gênero.

V.2 - *Salmonella* spp e indicadores de contaminação fecal em amostras de bivalves

Os resultados das coletas de bivalves realizadas na área adjacente a seis portos brasileiros, revelaram a presença de *Salmonella* em quatro de um total de 21 amostras, sendo uma amostra coletada em Recife e três amostras coletadas em Santos, representadas por *C. rhizophorae*, *P. perna* (2) e *A. brasiliana*, respectivamente (Tabela 2). A presença de *Salmonella* esteve relacionada à concentrações de coliformes termotolerantes de 23, 4 e 21NMP/g, demonstrando não haver correlação entre a presença desse patógeno e os coliformes termotolerantes. Este fato é confirmado pelas concentrações acima de 1.110 NMP/g em bivalves coletados em Paranaguá e Santos, pertencentes às espécies *M. charruana*, *A. brasiliana* e *P. perna*, nos quais *Salmonella* não foi isolada.

S. enterica sorovares Typhimurium, Saintpaul, Panama e Livingstone foram identificados em amostras coletadas na região do entorno do porto de Santos de amostras de *A. brasiliana* e *P. perna*, e *S. Typhimurium* foi identificada em uma amostra de *C. rhizophorae* analisada da região portuária de Recife. É interessante observar que, assim como o sorotipo *S. Saintpaul* (O: 4 [B]) foi identificado na água de todos os portos, onde *Salmonella* foi identificada, o sorotipo foi também identificado em um espécime de *A. brasiliana* proveniente da área do porto de Santos (Tabela 3).

Tabela 1. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados em amostras de água de regiões portuárias brasileiras.

		Parâmetros Microbiológicos			Parâmetros Físico – Químicos Analisados					Qualidade Microbiológica / Risco *	
Região Portuária	Amostras Coletadas	CT _T UFC/100mL	EF UFC/100mL	<i>Salmonella</i> spp em 2 L	Profundidade Metros	Temperatura °C	Salinidade ‰	Condutividade µS	pH	R	S
Belém/PA	6	400 - > 20.000	4 - 100	5	4,5 - 10,2	29,0 - 29,5	0,0 - 0,1	80,5 - 313	ND	5	1
Paranaguá (PR)	18	16 - 920	0 - 6	5	2,0 - 12,5	15,0 - 35,0	16,8 - 26,7	16,0 - 42,6	6.0 - 8.0	0	18
Recife (PE)	24	0 - 200	< 1 - 1	4	4,0 - 11,0	23,1 - 29,0	8,2 - 34,9	14,14 - 52,7	7.0 - 7.5	0	24
Santos (SP)	24	2 - 410	< 1 - 56	4	8,0 - 23,0	20,5 - 24,6	10,8 - 32,5	18,3 - 49,1	6.5 - 8.5	0	24
Rio Grande (RS)	6	0 - 150	< 1 - 50	0	5,0 - 19,0	20,0 - 21,0	0,0 - 0,1	78,2 - 145,3	5.5 - 6.0	0	6
Fortaleza (CE)	6	0 - 1.600	< 1 - 3	0	4,5 - 12,0	26,5 - 27,0	5,5 - 36,9	43,3 - 1.017	ND	1	5
Itaguaí (RJ)	6	0	< 1	0	2,0 - 20,0	22,0 - 23,0	30,8 - 32,6	50,6 - 54,3	ND	0	6
Total	90			18							

Legenda: CT_T = Coliformes Termotolerantes à 45oC UFC/100 mL; EF = *Enterococos faecalis* UFC/100mL;
 UFC = Unidades Formadoras de colônias; TDS = Totais sólidos dissolvidos;
 R = avaliado como ruim; S = satisfatório de acordo com *RDC CONAMA 274/00 sobre balneabilidade das águas.
 ND = Não Determinado

Tabela 2. Parâmetros microbiológicos analisados em amostras de moluscos bivalves coletados no entorno de regiões portuárias brasileiras.

Região Portuária	Espécie	Nome Vulgar	CT NMP/g	CT _T NMP/g	N ° de Isolados de <i>Salmonella</i> spp / amostra	Sorotipos/Grupos	Perigo Microbiológico / Risco *
Santos/SP	<i>Perna perna</i>	Marisco	40	4	2	S. Typhimurium (O:4 B) S. Panama (O:9 D1)	Sim
	<i>Anomalocardia brasiliana</i>	Berbigão	>1100	21	4	S. Typhimurium (O:4 B) 3 isolados S. Saintpaul (O:4 B) 1 isolado	Sim
	<i>Perna perna</i>	Marisco	40	4	1	S. Livingstone (O:7 C1)	Sim
	<i>Anomalocardia brasiliana</i>	Berbigão	1100	150	0	-	Provavel
	<i>Mytella charruana</i>	Sururu	>1100	>1100	0	-	Provavel
	<i>Perna perna</i>	Marisco	200	90	0	-	Não
	<i>Anomalocardia brasiliana</i>	Berbigão	150	90	0	-	Não
	<i>Perna perna</i>	Marisco	40 [†]	4 [†]	0 [†]	-	Sim <i>V. cholerae</i> O1 ctx+tcp+
Recife/PE	<i>Tagellus plebeius</i>	Unha-de- Velho	500	NR	0	-	Não
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ostra	200	23	1	S. Typhimurium(O:4 B)	Sim
	<i>Mytella charruana</i>	Sururu/Bacucu	500	<3	0	-	Não
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ostra	<3	<3	0	-	Não
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ostra	90	28	0	-	Não
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ostra	500 [†]	200 [†]	0 [†]	-	Sim <i>V. cholerae</i> não O1 ctx+tcp-
Paranaguá/PR	<i>Mytella charruana</i>	Bacucu	>1100	>1100	0	-	Sim
	<i>Perna perna</i>	Marisco	>1100	>1100	0	-	Sim
	<i>Perna perna</i>	Marisco	>1100	1100	0	-	Sim
Rio Grande/RS	<i>Perna perna</i>	Mexilhão/Marisco	500	4	0	-	Não
Itaguaí/RJ	<i>Anomalocardia brasiliana</i>	Sururu	15	<3	0	-	Não
	<i>Mytella charruana</i>	Mexilhão	500	11	0	-	Não
Fortaleza/CE	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ostra	15	<3	0	-	Não
Total	21				8		

NMP = Número mais provável; CT_T= coliformes totais, CF = coliformes termotolerantes; *Portaria ANVISA No. 12/2001; RDC CONAMA 357/05 ([†] *V. cholerae*), água de cultivo de moluscos bivalves;

Tabela 3. Frequência de sorotipos e sorogrupos de *Salmonella* spp. Identificados em diferentes tipos água e moluscos bivalves de regiões portuárias brasileiras.

Sorogrupo	Sorotipo	Belém	Paranaguá, Recife e Santos	Bivalve Santos e Recife
O:4 [B]	S.Saintpaul	4	48	1
	S.Sandiego	2	0	0
	S. Agona	0	21	0
	S. Typhimurium	0	0	5
	S. I 1,4,12:eh:-	0	1	0
	S. I 4,5,12:eh:-	0	1	0
O:7 [C1]	S. Infantis	1	0	0
	S. Livingstone	0	46	1
	S. Lille	0	15	0
O:8 [C2C3]	S. Albany	5	0	0
O:9 [D1]	S. Miami	1	0	0
	S. Panama	6	0	1
O: 3,10 [E1]	S. Anatum	0	22	0
	S. Give	0	13	0
O:1,3,19 [E4]	S. Senftenberg	0	8	0
O:3 [G]	S. Grumpensis	1	0	0
	S. Kedougou	0	3	0
O: 16 [I]	S. Yoruba	0	1	0
O: 18 [K]	S. Cerro	0	1	0
O:42 [T]	S. II	0	1	0
	S. I rugosa	0	5	0
Total		20	186	8

V.3. Suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella enterica* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves

De forma geral, 95,6% dos isolados obtidos de água apresentaram resistência a pelo menos um dos 14 antimicrobianos testados. Na água do porto de Belém, dos 20 isolados 75% apresentou resistência de três a seis agentes antimicrobianos. Entre os 32 isolados de água do porto de Recife, a resistência ocorreu em 87,5% delas e entre os isolados da água dos portos de Santos e Paranaguá, todos apresentaram resistência de um a até 10 agentes antimicrobianos, demonstrando que estas áreas recebem uma descarga maior destes agentes no ambiente aquático, levando a uma maior pressão seletiva e conseqüente multiresistência nos microrganismos (Tabela 4).

Entre os isolados de água, prevaleceu fenótipo de resistência a Cefuroxima (CRX).

O isolado de *Salmonella* Typhimurium da amostra de molusco bivalve da área do porto de Recife foi resistente a quatro agentes antimicrobianos, enquanto que os outros sete isolados da área de Santos apresentaram resistência de um a cinco agentes antimicrobianos, sendo que os isolados de *S. Typhimurium* obtidos de amostras diferentes de bivalves (*A. brasiliiana* e *P. perna*) apresentaram o mesmo perfil de resistência. Nenhum dos isolados provenientes das amostras de bivalves apresentou o mesmo perfil dos isolados das amostras de água (Tabela 4).

Entre as amostras isoladas de molusco bivalve coletados em Santos, quatro cepas de *S. Typhimurium*, prevaleceu o perfil de resistência a AMC CAZ ATM CLO FLF sobre os demais isolados.

V.4. Caracterização molecular por grupos de *Salmonella enterica* isoladas de amostras de água e moluscos bivalves

Todos os isolados de *Salmonella* obtidos de amostras de água e bivalves foram caracterizados pela técnica de PCR utilizando

oligonucleotídeos baseados no agrupamento genético *rfb* de *Salmonella* o qual identifica os principais sorogrupos deste gênero (A-D1, B e C2-C3).

Dos 214 isolados, 94 foram sorologicamente identificados como pertencentes aos sorogrupos B, C2-C3 e D1. Destes, 93,6% (88) confirmaram pertencerem a estes sorogrupos, através da PCR. Entre os 82 isolados do grupo O: 4 [B], apenas 92,7% confirmaram genotipicamente, do grupo O:9 [D1] todos os sete isolados foram confirmados, assim como todos os oito isolados do grupo O: 8 [C2-C3]. Além disso, houve um isolado de *S. Panamá* O:9 [D1] de molusco bivalve que apresentou resultados positivo na PCR, tanto com a seqüência do sorogrupo A/D1 quanto B (Tabela 5). As amplificações para os grupos específicos podem ser conferidas nas figuras de 1 a 5.

Tabela 4. Sorotipo, grupo sorológico, perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e determinação dos grupos A/D1, B e C2-C3 através de PCR nos isolados de *Salmonella* de amostras de água em regiões portuárias brasileiras.

Área Portuária	Sorotipo	Sorogrupo	N° de Cepas	Perfil de resistência														PCR		
				CTX	AMP	CRX	KAN	AMI	CIP	PPT	AMC	CAZ	ATM	SUT	CLO	FLF	GEN	A-D1	B	C2-C3
Belém	S.Panama	O:9 [D1]	1															+	-	-
	S.Grumpensis	O:3 [G]	1															-	-	-
	S.Miami	O:9 [D1]	1															+	-	-
	S.Albany	O:8 [C2C3]	2															-	-	+
	S.Sandiego	O:4 [B]	2	R	R			R				R	R	R				-	+	-
	S.Infantis	O:7 [C1]	2	R			R					R	R		R	R		-	-	-
	S.Albany	O:8 [C2C3]	3									R	R	R				-	-	+
	S.Panama	O:9 [D1]	4	R								R	R	R	R	R		+	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	4	R							R	R	R					-	+	-
Sub Total			20																	
Recife	S.Saintpaul	O:4 [B]	1										R					-	+	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	1	R														-	+	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	1	R	R													-	+	-
	S. Livingstone	O:7 [C1]	1	R		R		R	R				R		R	R		-	-	-
	S. Kedougou	O:3 [G]	3	R		R	R											-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	4															-	+	-
	S. Agona	O:4 [B]	21	R		R			R			R	R				R	-	+	-
Sub Total			32																	
Santos	S. Livingstone	O:7 [C1]	45	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R					-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	1	R	R	R												-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	1	R	R	R												-	+	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	10		R	R												-	+	-
	S. Yoruba	O: 16 [I]	1		R													-	-	-
Sub Total			58																	

Continuação

Área Portuária	Sorotipo	Sorogrupo	Nº de Cepas	Perfil de resistencia														PCR		
				CTX	AMP	CRX	KAN	AMI	CIP	PPT	AMC	CAZ	ATM	SUT	CLO	FLF	GEN	A-D1	B	C2-C3
Paranaguá	S. I 1,4,12:eh:-	O:4 [B]	1	R								R	R					-	+	-
	S.I 4,5,12:eh:-	O:4 [B]	1	R				R					R					-	+	-
	S.II	O:42 [T]	1	R			R						R	R	R	R		-	+	-
	S. Cerro	O: 18 [K]	1		R													-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	5			R						R	R					-	-	-
	S. I rugosa		5			R				R								-	-	-
	S. Senftenberg	O:1,3,19 [E4]	8			R						R	R					-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	11	R			R						R	R	R	R		-	+	-
	S. Give	O: 3,10 [E1]	13		R	R	R			R		R						-	-	-
	S.Saintpaul	O:4 [B]	13			R						R	R					-	+	-
	S. Lille	O:7 [C1]	15	R	R	R						R	R	R	R	R	R	-	-	-
	S. Anatum	O: 3,10 [E1]	22		R	R							R					-	-	-
Sub Total			96																	
Total			206																	

R: Resistente

CTX (cefotaxima); AMP (ampicilina); CRX (cefuroxima); KAN (kanamicina); AMI (amicacina); CIP (ciprofloxacina); PPT (piperacilina+tazobactan); AMC (ácido clavulâmico+amoxicilina); CAZ (ceftazidima); ATM (aztreonama); SUT (cotrimoxazol ou sulfatrin); CLO (cloranfenicol); FLF (florfenicol); GEN (gentamicina).

Tabela 5. Sorotipo, grupo sorológico, perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e determinação dos grupos A/D1, B e C2-C3 através de PCR nos isolados de *Salmonella* de amostras de moluscos bivalves coletados de regiões brasileiras.

Área Portuária	Espécie de Bivalve	Sorotipo	Sorogrupo	Nº de cepas	Perfil de resistência														PCR		
					CTX	AMP	CRX	KAN	AMI	CIP	PPT	AMC	CAZ	ATM	SUT	CLO	FLF	GEN	A-D1	B	C2-C3
Recife	<i>C. rhizophorae</i>	S. Typhimurium	O:4 [B]	1		R		R	R	R									-	+	-
	<i>A. brasiliensis</i>	S. Typhimurium	O:4 [B]	3								R	R	R		R	R		-	+	-
		S. Saintpaul	O:4 [B]	1		R	R	R											-	+	-
Santos	<i>P. perna</i>	S. Typhimurium	O:4 [B]	1								R	R	R		R	R		-	+	-
		S. Panama	O:9 [D1]	1										R		R	R		+	+	-
		S. Livingstone	O:7 [C1]	1			R												-	-	-
Total				8																	

R: Resistente

CTX (cefotaxima); AMP (ampicilina); CRX (cefuroxima); KAN (kanamicina); AMI (amicacina); CIP (ciprofloxacina); PPT (piperacilina+tazobactam); AMC (ácido clavulâmico+amoxicilina); CAZ (ceftazidima); ATM (aztreonama); SUT (cotrimoxazol ou sulfatrin); CLO (cloranfenicol); FLF (florfenicol); GEN (gentamicina).

FIGURA 1

Ensaio utilizando cepas controle positivo dos Sorogrupos A/D1(*S. Typhi* O-901 IAL 1251), B (*S. Typhimurium* IAL1434/Koch 6693) e C2-C3 (*S. Newport* IAL 1195) utilizadas como controles positivo para os respectivos grupos no ensaio uniplex *rfb* PCR. 1 - Padrão de peso molecular selecionado λ DNA/*Hind III*(VJR); 2- Controle positivo grupo B; 3 - Controle negativo da reação grupo B água; 4- Controle positivo grupo C2-C3; 5- Controle negativo C2-C3; 6- Controle positivo grupo D1; 7- Controle negativo D1; 8- λ DNA/*Hind III*(VJR) 5 μ L.

FIGURA 2

Amostras de Moluscos Bivalves testadas com primers grupo B. 1: Padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III; 2 a 9: Amostra positiva para o grupo B = 873 pb; 10: Controle Positivo *S. Typhi* grupo B = 895 pb; 11: Controle Negativo B; 12: Padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III.

Amostras de Moluscos Bivalves testadas com primers grupo A-D1. 1: Padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III; 2 a 5: Amostra negativas para grupo A-D1; 6: Amostra positiva para grupo A-D1; 7 a 9: Amostra negativas para grupo A-D1; 10: Amostra de controle positivo *S. Typhi* grupo A-D1; 11: Amostra negativas para grupo A-D1; 12: Padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III.

FIGURA 3

Amostras de Moluscos Bivalves testadas com primers grupo A-D1, B, C2-C3. 1: Padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III; 2: Amostra negativa para grupo A-D1; 3 e 4: Controle Positivo *S.Typhi* grupo A-D1 = 716pb; 5: Controle Negativo A-D1; 6: Amostra negativa para grupo B; 7 e 8: Controle Positivo *S.Typhimurium* grupo B = 880 pb; 9: Controle Negativo B; 10: Amostra negativa para grupo C2-C3; 11 e 12: Controle Positivo *S.Newport* grupo C2-C3 = 815 pb; 13: Controle Negativo para grupo C2-C3; 14: Controle Positivo *S.Typhi* grupo A-D1 = 735 pb; 15: Amostra negativa para grupo A-D1; 16: Controle Positivo *S.Typhi* grupo A-D1 = 735 pb; 17: Controle Negativo para grupo A-D1; 18: Amostra negativa para grupo A-D1; 19: Controle Positivo *S.Typhi* grupo A-D1 = 754pb; 20: Controle Negativo para o grupo A-D1.

FIGURA 4

Ensaio grupo A-D1 para amostras de *Salmonella* isoladas em água 1 - Padrão de peso molecular selecionado λ DNA/*Hind III*; 2 a 4: Cepas Negativas para grupo A-D1; 5: Controle Positivo *S. Typhi* para grupo A-D1 = 762 pb; 6: Controle Negativo grupo A-D1; 7 a 19: Cepas Negativas grupo A-D1; 20: Cepa Positiva para grupo A-D1; 21 a 23: Cepas Negativas para grupo A-D1; 24: Controle Positivo *S. Typhi* para grupo A-D1 = 762 pb; 25 e 26: Cepas Negativas grupo A-D1.

Ensaio grupo C2-C3 para amostras de *Salmonella* isoladas em água 1 - Padrão de peso molecular selecionado λ DNA/*Hind III*; 2 a 10: Cepas Negativas para grupo C2-C3; 11: Cepa Positiva para grupo C2-C3 B = 823 pb; 12 e 13: Cepas Negativas grupo C2-C3; 14: Controle Positivo *S. Newport* para grupo C2-C3 = 823 pb; 15 a 21: Cepas Negativas para grupo C2-C3; 22: Controle Positivo *S. Newport* para grupo C2-C3 = 823 pb; 23: Controle Negativo grupo C2-C3; 24 a 26: Cepas Negativas grupo C2-C3.

FIGURA 5

Ensaio grupo B para amostras de Salmonella isoladas em água. 1 - Padrão de peso molecular selecionado λ DNA/*Hind III*; 2 a 5: Cepas Negativas para grupo B; 6 a 8: Cepas Positivas para grupo B = 888 pb; 9 a 13: Cepas Negativas grupo B; 14 a 17: Cepas Positivas para grupo B = 888 pb; 18 a 21: Cepas Negativas para grupo B; 22 a 26: Cepas Positivas para grupo B = 888 pb.

Ensaio grupo B para amostras de Salmonella isoladas em água. 1 - Padrão de peso molecular selecionado λ DNA/*Hind III*; 2: Cepas Positivas para grupo B = 924 pb; 3: Cepas Negativas para grupo B; 4: Cepas Positivas para grupo B = 924 pb; 5 a 8: Cepas Negativas para grupo B; 9 e 10: Cepas Positivas para grupo B = 924 pb; 11: Cepas Negativas para grupo B; 12: Cepas Positivas para grupo B = 924 pb; 13 a 21: Cepas Negativas para grupo B; 22 e 25: Cepas Positiva *S. Typhimurium* grupo B = 924 pb; 23 e 24: Cepas Negativas para grupo B; 26: Controle Negativo para grupo B.

VI. DISCUSSÃO

Os ecossistemas aquáticos estão sendo gradativamente contaminados por atividades antrópicas, contribuindo para a disseminação de microrganismos patogênicos para o homem e animais, tais como as salmonelas (BRENNER et al., 2000), as quais têm sido isoladas a partir de fontes ambientais, tais como água doce (VALENTINI et al., 1995), estuarina e marinha (SAYLER et al., 1976; MARTINS et al., 1988 RISTORI et al., 2007) e também de alimentos, incluindo os marinhos (HEINITZ & JOHNSON, 1998; WILSON and MOORE, 1996; RISTORI et al., 2007).

Desta forma, diante do risco para a saúde da população que vive nas adjacências de áreas portuárias e que faz uso da água destas áreas em atividades recreacionais ou ocupacionais, como também, consome os bivalves de bancos naturais ou cultivos situados em áreas próximas, foi realizado esse estudo para avaliar a qualidade microbiológica da água e bivalves destas áreas, inclusive, verificando a presença de *Salmonella* spp.

Para verificar a adequação da qualidade microbiológica da água para atividades recreativas de contato primário, onde existe maior possibilidade de se engolir água (balneabilidade), foi utilizada a Resolução CONAMA 274/00, a qual considera a água como própria ou imprópria para essa atividade, ainda subclassificando as águas próprias como: 1) Excelente: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 250 coliformes termotolerantes ou 200 *Escherichia coli* ou 25 Enterococos por 100 mililitros; 2) Muito Boa: no máximo, 500 coliformes termotolerantes ou 400 *E. coli* ou 50 Enterococos por 100 mililitros; 3) Satisfatória: no máximo 1.000 coliformes termotolerantes ou 800 *E. coli* ou 100 Enterococos por 100 mililitros.

No Brasil existem duas legislações destinadas a avaliar a qualidade de águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana: 1) a mais recente, a Res. CONAMA 357/05 que estabelece que a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deve exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deve ultrapassar 88 coliformes termotolerantes

por 100 mililitros. Essa legislação ainda estabelece que esses índices devem ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras; 2) Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1988) determina que acima de 700 coliformes termotolerantes por 100ml de água, a área é proibida para o cultivo, entre 70 e 700 CF/100ml, a área é limitada, sendo indispensável o tratamento dos moluscos através da depuração e quando abaixo de 70 CF/100ml a área livre para o cultivo. Mariscos e outros desta categoria somente estão em nível de segurança para o consumo humano se houver ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas.

A resolução CONAMA 357/05 ainda estabelece a classificação das águas superficiais em águas doces (salinidade $\leq 0,5\text{‰}$), salobras ($>0,5\text{‰}$ e $< 30\text{‰}$) e salinas ($\geq 30\text{‰}$) e também o enquadramento dessas águas em classes, como forma de garantir a defesa dos níveis de qualidade e assegurar seu uso preponderante.

Assim sendo, água do porto de Belém foi enquadrada como água doce da classe 4 (finalidade de uso de navegação) e apresentou elevada concentração de coliformes termotolerantes (2.900 a 20.000 UC/100 mL) em cinco dos seis pontos de coleta ao longo da região portuária, os quais tiveram também a presença de *Salmonella*. Apesar da análise pontual, a região demonstrou ser imprópria para uso de contato primário, como também, para captação de água para lastro dos navios.

O isolamento de *Salmonella enterica* nos portos de Paranaguá, Recife e Santos, ocorreu com concentrações de CT_T e EF que variaram respectivamente, 16-920 UFC/100mL e $<1-6$ UFC/100mL; $<1 - 200$ UFC/mL e <1 UFC/mL; $<1-410$ UFC/100mL e $<1-56$. A água da região portuária do Recife foi classificada como água salina de classe 2 e a água dos portos de Santos e Paranaguá como salobra de classe 2. Apesar das áreas em questão poderem ser consideradas como satisfatórias pelos índices de CT_T , com relação à balneabilidade, a presença de *Salmonella enterica* em 27,8%, 16,7%, 16,7% das amostras coletadas nos portos de Paranaguá, Recife e Santos compromete seu uso para esse fim. A contaminação dessas regiões portuárias pode disseminar para outras áreas, através do lastro de navios ou através de correntes marítimas e atingir regiões de pesca e cultivo de mariscos.

Apesar da região portuária do Rio Grande haver apresentado baixa salinidade (0,0 – 0,1 ‰), o que classificaria este porto como de água doce, trata-se de porto de água salina. Este fato pode ser explicado pela geografia da região portuária do Rio Grande, que se encontra conformado no interior de uma baía, passando a sofrer influência direta da água dos braços de rios que lá deságuam. Talvez, o baixo teor de salinidade e a relativa acidez apresentados pela água no período da coleta, não tenha desfavorecido o isolamento de *Salmonella* nesta região.

No porto de Fortaleza, apenas um dos pontos de coleta apresentou índice insatisfatório com relação à contagem de coliformes termotolerantes, mas sem presença de *Salmonella*. Contudo, numa análise geral, os portos relacionados não apresentaram risco microbiológico para captação do lastro e nem para áreas próximas de uso recreacional e consumo de moluscos bivalves.

Segundo a RDC ANVISA 12/02, foram verificados números acima dos permitidos (10^2 NMP/g) nas amostras de bivalves coletadas nos portos de Paranaguá, Santos e Recife, para consumo de moluscos, representadas por *M. charruana*, *P. perna*, *C. rhizophorae*, e *A. brasiliana*.

A presença de cepas do gênero *Salmonella* spp nas regiões do entorno portuário de Recife e Santos, esteve diretamente relacionada quando as concentrações de presentes CT e CT_T variaram, respectivamente, 40 até > 1100 NMP/g e entre 4 a 23 NMP/g, nos espécimes analisados. Se compararmos com a legislação do Ministério da Agricultura e mais atualmente com a legislação CONAMA (357/05) para áreas de criação, manutenção e extração de moluscos bivalves, a água do entorno poderia ser considerada como área livre. Contudo, considerando que o produto pode ser consumido cru, a norma RDC 12 ANVISA (BRASIL, 2001) considera como limites 100 coliformes termotolerantes por grama e ausência em 25 g de conteúdo estomacal de molusco bivalve do gênero *Salmonella* além de *Vibrio parahaemolyticus* (1.000/g) e *Staphylococcus aureus* (5.000/g).

A presença de *Salmonella* no ambiente aquático requer avaliação do significado na transmissão e disseminação das salmoneloses, bem como para

localizar os principais fatores de risco e adotar medidas de controle visando a sua interrupção, redução ou erradicação como causa da doença (SANCHEZ, 1988).

Os sorotipos identificados podem significar que a rota de chegada destes microrganismos neste ambiente pode ter origem na presença de esgotos clandestinos, que são dejetados sem tratamento nestas regiões ou outras atividades antrópicas que propiciem a entrada de matéria orgânica nestas águas (SANCHEZ, 1988). O risco da presença destes sorotipos de *Salmonella* nas águas portuárias é maior pela circulação das marés, a geografia apresentada pela região costeira do porto e o clima que podem conduzir o patógeno através da sua orla chegando a pontos distantes. O consumo de alimentos marinhos extraídos destas regiões, também poderia representar risco, transformando o homem como ultimo portador do patógeno e aumentando a notificação de surtos causados por ingestão de alimentos que tem como agente etiológico *S. enterica*.

Em Paranaguá e Recife, observa-se a prevalência dos sorotipos *S. Anatum*, *S. Give*, e *S. Saintpaul*, *S. Agona*, respectivamente. Enquanto a região portuária de Belém foi identificada cepas de sorotipos representantes dos principais sorogrupos de *Salmonella* (A/D1, B e C2-C3), respectivamente, *S. Miami* e *S. Panamá*, *S. Saintpaul* e *S. Sandiego* e *S. Albany*.

Salmonella estão entre os mais comuns patógenos de origem alimentar em todo o mundo (TODD, 1997). Estima-se que somente nos Estados Unidos 1.4 milhões de casos de doenças de origem alimentar ocorram a cada ano (VOETSCH et. al., 2004). A sorotipagem de *Salmonella* é uma ferramenta de vigilância que detecta a disseminação de surtos, identificando fontes, rastreando e atribuindo doenças humanas a diversos alimentos e animais (HALD et. al., 2004). Baseado nestes conceitos, a WHO através do WHO Global *Salm-Surv*, agregou por meios eletrônicos um banco de dados permanente, alimentados por laboratórios de referencia situados em varias partes do mundo (GALANIS et. al., 2006).

O Brasil participa do programa de vigilância em salmoneloses do WHO *Salm-Surv*, através do laboratório de referencia do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Dados-epidemiológicos levantados no sitio *Salm-Surv*, neste

estudo, revelaram que os sorotipos identificados em amostras de água e moluscos bivalves, circulavam em fontes humanas e não humanas entre 2000 até 2006, segundo bases de dados depositadas pelo laboratório do Instituto Oswaldo Cruz (www.who.int/salmsurv).

S. Saintpaul, que frequentemente (25,2%) (52/206) foi isolado em todos os portos e em um espécime de bivalve coletado aparece, entre 2000 e 2006, em todas as fontes de rastreamento: humana, animal, ambiental e alimentos. S. Livinstone, prevalente em amostras de água no porto de Santos e em uma amostra de bivalve selecionada na mesma região, esteve associada principalmente a isolados de ração animal em 2006. S. Agona que ocorreu taxativamente em Recife em amostras de água, esteve ubiquamente presente em fontes humanas, animais, rações, alimentos e ambientais entre todos os anos levantados. Em Paranaguá, onde as maiores ocorrências foram dos sorotipos S. Anatum e S. Give, os sorotipos aparecem mais frequentemente isolados em amostras de origem animal e ambiente. Os demais sorotipos isolados, não aparecem ou aparecem em baixa frequência neste levantamento.

Em um levantamento ocorrido entre 2000 a 2002, a OMS através do **WHO Global Salm-Surv**, causados por *Salmonella* nos continentes Africano, Asiático, Europeu, Norte Americano e da América Latina/Caribe, não incluindo o Brasil relatou cerca de 377,000 casos de surtos em humanos e 66,000 em não humanos (GALANIS et. al., 2006). No Brasil, surtos de origem alimentar, os quais são notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica, correspondem a 41% dos episódios causados por *Salmonella* spp. (CARMO et. al., 2004).

No período de 1974-1977, no Estado de São Paulo e cidades do litoral sul, foi avaliado o significado sanitário da presença de *Salmonella* em ambientes aquáticos num total de 894 amostras examinadas de água doce, água do mar, esgoto e água tratada. Foi isolado um total de 5.430 cepas de *Salmonella* contendo os mais diversos sorotipos, nos diversos ambientes aquáticos analisados, considerados de importância clinicamente patogênica. Há 28 anos atrás, dentre os sorotipos isolados de amostras de água do mar nas cidades do litoral sul paulistano, a prevalência dos tipos circulantes era dos sorogrupos S. Agona e Typhimurium (81,7%), seguidos por S. Livingstone e Infantis (47,9%) (MARTINS, 1979). Outro trabalho mostrou a presença

prevalente de *S. Typhimurium* e *S. enterica* subespécie *arizonae* em amostras de mexilhão coletadas em reservas de banco naturais, no litoral paulista na mesma época do estudo acima (LOPES et. al., 1979).

Em Belém a presença de *Salmonella* no meio ambiente foi constatada a partir do isolamento de 62 cepas em amostras de esgoto, 38 em águas de rios e 31 de igarapés (FARIAS, 1997). Loureiro (1990), também isolou 43 cepas em água de esgoto com 21 sorotipos diferentes e padrões semelhantes aos encontrados nas coproculturas isoladas na mesma época do estudo da população humana.

Embora dados na literatura descrevam o isolamento de *Salmonella*, do sorotipo *S. Agona* encontraram nas águas das praias do Rio de Janeiro, (RODRIGUES et. al., 1989), este sorotipo também foi verificado no sistema de esgoto da cidade de Niterói (HOFER & COSTA, 1972), e sorovares de *Salmonella* tenham sido descritos em 25 episódios de toxinfecção alimentar entre 1982 a 1991, sendo o sorotipo *S. Emek*, cuja rara ocorrência em nosso meio, foi responsável por toxinfecção alimentar no município de Macaé no Rio de Janeiro (HOFER & REIS, 1994).

Num estudo, sobre áreas com influência direta e/ou indireta, de esgoto no ambiente marinho costeiro de parias do litoral de Fortaleza, várias amostragens nas áreas de dejeção direta de esgoto, identificaram *Salmonella*, sugerindo uma distribuição espacial do microrganismo que levado pela correnteza das áreas contaminadas dispersaria o patógeno por toda orla marítima sendo concentrados por organismos bivalves (MELO et. al., 1997). Em amostragens de areia das praias de Mucuripe, Futuro e Caça e Pesca, em Fortaleza, foi identificada a presença de *S. Agona* associados com o isolamento de outros patógenos entéricos humanos (VIEIRA et. al., 2001).

Os moluscos bivalves são organismos micrófagos, ou seja, organismos que se alimentam de microrganismos e partículas orgânicas suspensas na água (BARNES, 1984). Fixos em substratos vivem em estuários de rios e costa marítima, onde filtram a água para captar alimentos e, desta forma, concentram e representam a contaminação, tanto no aspecto microbiológico como no químico. (FAYER et. al., 1992; FALCONER, 1993; MADDEN et. al., 1982 apud MORAES et. al., 2000).

Tanto excretas humanos quanto animais são fontes de *Salmonella* e algumas rotas potenciais são utilizadas para a transmissão destes patógenos entéricos excretados (BAUDART et. al., 2000). Uma destas rotas pode ser através da água dos rios e das chuvas, que chegam ao ambiente marinho costeiro, sendo concentrados pelos organismos bivalves (UTARZA-MARTINEZ et. al., 2004[a]; BAUDART et. al., 2000).

Desta maneira, quando extraídos de águas costeiras contaminadas por matéria orgânica, bactérias podem constituir uma porção substancial da dieta destes organismos filtradores, que colonizam seu intertegumento e intestinos (ZOBELL AND FELTHAM, 1938; MCHENERY & BIRKBECK, 1985). E chegando a desenvolver uma relação histórica bem documentada envolvendo surtos de origem alimentar por contaminação química e microbiológica que representam risco à saúde humana principalmente pelo hábito de consumo destes moluscos “in natura” (FALCONER, 1993; FAYER et. al., 1992; MADDEN et. al., 1982 apud MORAES et. al., 2000; WOOD, 1976).

Ristori (2000), num trabalho conduzido, no sul do litoral paulista, em Cananéia, encontrou os sorotipos S. Sandiego, S. Rubislaw e S. Zerifin em água em água e S. Houtenae em apenas um lote de ostra do mangue, que segundo um levantamento sobre frequência de sorotipos, realizado em *Salmonella* no Estado de São Paulo confirmou que estes sorotipos eram pouco freqüentes tanto em amostras de origem clínica quanto oriundas de alimentos (TAVECHIO et. al., 1996); mas foram presentes em água de estuário e concentrados por molusco bivalve (RISTORI, 2000).

Em um levantamento da Divisão de Vigilância Sanitária do programa de controle de enfermidades transmitidas por alimentos, através de um relatório de ETAs (Estações de Tratamento de Água) conduzidos no Rio Grande do Sul (RS), analisadas entre 1987 até 1998, concluiu que *Salmonella* spp. estava presente em 261 (31,5%) das estações e que surtos que tiveram como origem a água contaminada, caracterizavam um total de 13 (0,9%) em todo o Estado (SILVA, E.A., 2005).

No Brasil, até o momento, não foi detectado nenhum surto de infecção por salmonela de grande magnitude, como os surtos multi-estaduais – que passam de um estado para o outro – relatados na literatura. Mesmo assim, é

preciso manter o trabalho de controle da doença. “Os estados onde mais se detectam surtos por salmonela é o Rio Grande do Sul, o Paraná e São Paulo. Em parte, isso acontece porque esses estados têm uma maior capacidade de detecção”, segundo Eduardo Hage do Ministério da Agricultura (<http://portalweb02.saude.gov.br/portal/>).

A tentativa de estabelecer uma relação entre os sorovares mais freqüentes no meio ambiente torna-se dificultoso, devido à variabilidade na freqüência destes sorovares de um ambiente para outro, o que torna difícil efetuar qualquer tipo de confronto com maior profundidade dos dados citados na literatura. Tendo em vista as particularidades de que cada região analisada ou aglomerado populacional determina a epidemiologia das salmoneloses, bem como, as influências ecológicas sobre a ocorrência de certos sorovares de *Salmonella* (LOUREIRO, 1990).

Melo et. al. (1997) ao avaliarem a influência do lançamento de águas de esgoto na balneabilidade de algumas praias de Fortaleza (CE) contataram que, embora as áreas que sofriam influência direta dos esgotos fossem as com maior índice de isolamento de *Salmonella*, regiões distantes a estas também passavam a ser atingidas pela sua circulação nas águas. Em Recife, entre 1999 a 2000, foi realizado um estudo sobre a qualidade microbiológica de ostras comercializadas oriundas do extrativismo local. Além dos indicadores de contaminação fecal, obteve-se o isolamento de duas cepas de *Salmonella enterica* sorovar Albany (O:8 C2-C3) e outra Infantis (O:7 C1) (MENDES, 2001). Contudo, trabalhos que relacionem a presença de sorogrupos de *Salmonella enterica* em amostras de moluscos bivalves nesta região portuária não são muito freqüentes, mas em episódios diarreicos com amostras de origem animal e/ou clínica revelaram a prevalência do sorogrupo B entre as cepas de *Salmonella enterica* subespécie I (LEAL et. al., 1987; HOFER et. al., 2000).

Dentre as amostras de moluscos bivalves, coletados nos portos de Paranaguá, Santos e Recife, foram verificados números de coliformes fecais acima dos permitidos (10^2 NMP/g) para consumo, venda e extrativismo de moluscos bivalves (RDC No. 12, ANVISA, 2001), e 37,5% e 16,7 % das amostras coletadas em Santos e Recife, apresentaram a presença de

Salmonella em 25 gramas. Sendo assim, os representantes de *C. rhizophorae*, em Recife, e *P. perna* (2) e *A. brasiliensis*, coletados em Santos, seriam considerados impróprios para consumo cru, pela presença de *Salmonella*/ 25g de seu conteúdo estomacal. Na região portuária de Paranaguá, as amostras de *M. charruana* e *P. perna* apresentaram concentrações elevadas de coliformes totais e termotolerantes (> 1.110 NMP/g) e ausência de *Salmonella*. A ausência de *Salmonella* ocorre em concentrações elevadas de CT e CT_T, indicando que *Salmonella*, não é um bom competidor com outras bactérias deste ambiente, entrando em estágio viável, mas não cultivável (ROSKAK et al., 1984). Contudo, a sobrevivência de *Salmonella* spp. em ambientes estuarinos já foi demonstrada, apesar da competição destas com bactérias autóctones do meio (RHODES & KATOR, 1988).

A ocorrência de infecções por *Salmonella* spp. devido ao consumo de alimentos marinhos, quando comparadas às ocasionadas por outros tipos de alimentos, é considerada baixa (LIPP & ROSE, 1997), mas em todo o mundo, casos de surtos de origem alimentar que envolvem o binômio, alimentos de origem marinha e infecção por *Salmonella* não tifóide, vêm aumentando em grandes proporções causando mortes e doenças de origem alimentar (CDC, 2000; MARTINEZ-URTAZA et al., 2003). Espécies bacterianas da família *Vibrionaceae*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e em particular *Vibrio*, *Campylobacter* e outras *Enterobacteriaceae*, dominam a microbiota da superfície externa, trato digestivo e órgãos internos de moluscos marinhos, por serem considerados indígenas do ambiente marinho, o isolamento de *Salmonella* fica comprometido pelo estresse competitivo entre as espécies bacterianas (ORTIGOSA et al., 1989; OLAFSEN et al., 1993).

Os riscos significativos associados às bactérias da família *Vibrionaceae*, da qual fazem parte *Aeromonas* e *Plesiomonas*, referem-se quando estes microrganismos estão presentes no alimento em números elevados (RIPPEY, 1994; FERNANDES et al., 1996).

Em Pernambuco e Fortaleza, cepas de *V. cholerae* O1 dos sorovares Inaba e Ogawa contidos tanto no ambiente aquático como em alimentos processados e ostras coletadas do ambiente estuarino, respectivamente, foram identificados (COLAÇO et al., 1998; SOUSA et al., 2004). Em nosso estudo, a presença de *V. cholerae* não O1^{ctx+tcp-}, em uma amostra de *C. rhizophorae*

coletada em Recife e *V. cholerae* O1^{ctx+tcp+} em amostra de *P. perna* coletada em Santos (SOUZA, 2007), foi verificado e poderia oferecer risco no consumo dos moluscos bivalves “in natura”.

A despeito deste fato, mesmo competindo com bactérias indígenas deste ambiente, a sobrevivência de *Salmonella* em ambientes estuarinos já foi demonstrada por meses em microcosmos de sedimento aquoso, sendo detectado em ostras desidratadas que não sofreram depuração (RHODES & KATOR, 1988; WILSON and MOORE, 1996).

Diferentes sorotipos agrupados nos sorogrupos entéricos B e D1 de *Salmonella enterica* têm sido isolados em países como, Irlanda do Norte, Espanha e Estados Unidos em amostras de molusco bivalve coletados de reservas dos bancos naturais, os quais alertam sobre o risco da presença deste microrganismo e o consumo deste alimento “in natura” (WILSON & MOORE, 1996; POLO et al., 1999; BAUDART et al., 2000; CATALÃO DIONÍSIO et al., 2000; MARTINEZ-UTARZA et al., 2004 [a,b]; BRANDS et al., 2005).

Contudo, trabalhos que relacionem a presença de sorogrupos de *Salmonella enterica* em amostras de moluscos bivalves nas regiões de Santos, Paranaguá e Recife, não são muito freqüentes, apesar do comprovado hábito de consumo de bivalves “in natura”. Na cidade do Recife, entre 1978 até 1980, relatos de episódios diarreicos humanos, observaram associação com 63 sorotipos agrupados em primeiro plano concentrados no grupo sorológico B (*S. Typhimurium*, *S. Saintpaul*, *S. Poona*, *S. Derby*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Oranienburg*, *S. Infantis*, *S. Tshiongwe* e *S. Ndolo*) (LEAL et al., 1987). Um frigorífico de abate de eqüídeos para exportação para países da Europa e Japão, revelou que animais já debilitados desenvolviam quadro de salmonelose antes do abate contaminando a carne de forma cruzada, dentre os sorotipos prevalentemente isolados se concentraram nos grupos O:4 (B), O:3,10 (E1) e O:6,14 (C1) (HOFER et al., 2000). Com relação à qualidade microbiológica de ostras comercializadas em mercado livre na cidade de Recife, foram isolados patógenos fecais relacionados com a identificação de duas cepas de *Salmonella enterica* sorovar Albany (O:8 C2-C3) e sorovar Infantis (O:7 C1) entre 1999 a 2000 (MENDES, 2001).

Em espécimes oriundos da área costeira da cidade de Santos, no litoral paulista, a presença de *Salmonella enterica* foi verificada em 04 amostras durante o presente estudo. Dentre os quais estiveram associadas aos sorotipos (grupo sorológico) S. Panama (grupo O:9 D1), S. Livingstone (O:7 C1) e S. Typhimurium (O:4 B), em duas amostras do espécime *P. perna*, e três S. Typhimurium (O:4 B) e uma S. Saintpaul (O:4 B) em amostra de *A. brasiliensis*. O sorogrupo O:4 foi prevalentemente identificado nas amostras de Recife e Santos. A circulação prevalente do sorogrupo B de *Salmonella* foi observada no final da década de 70, em amostras de moluscos bivalves, coletados em bancos naturais do litoral de São Paulo, inclusive na orla santista, o que pode evidenciar a circulação deste sorogrupo nestes organismos bivalves no litoral paulista há cerca de 30 anos (LOPES et al., 1979).

Os sorovares de *Salmonella* são caracterizados no Estado de São Paulo desde 1950, sendo conduzido até os dias atuais (FERNANDES et al., 2006). Durante a década de 70, S. Typhimurium foi o sorotipo de maior prevalência, notificado em todo estado, associados a surtos de origem alimentar (TAUNAY et al., 1996; TAVECHIO et al., 1996; TAVECHIO et al., 2002). Nas últimas décadas, no município de São Paulo um sorovar monofásico e atípico de S. Typhimurium prevalecendo entre os achados clínicos, porém observa-se a emergência de S. Enteritidis, em relação aos demais sorovares de *Salmonella* tanto em fontes clínicas quanto alimentares (ECHEITA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006).

S. Livingstone (O:7 C1), normalmente está associado aos focos de ração animal e ambiente avícola, é um sorotipo já identificado em diferentes Estados brasileiros, sendo infecções humanas causadas por este sorotipo consideradas acidentais. Assim como o sorotipo Livingstone, os sorotipos de S. Panama e Saintpaul dominam isolados na ordem de 84 % entre avícolas brasileiras em diferentes Estados (CRICHTON et al., 1996; HOFER et al., 1997; HOFER et al., 1998). Na literatura, não existe relação da presença especialmente do sorotipo Livingstone associados a alimentos marinhos aqui no Brasil, muito embora outro representante do grupo sorológico (S. Anatum O:7 C1) tenha sido identificado em duas amostras de bivalve na Espanha (MARTINEZ-UTARZA et al., 2004[a]).

As águas estuarinas podem ser utilizadas para aquicultura e extrativismo local graças a sua rica atividade biológica, porém, devem ser de boa qualidade microbiológica durante todo o ciclo do cultivo (BALDINI ET. AL., 1999).

Porém, o lançamento de esgoto sem tratamento sanitário no oceano implica necessariamente no acompanhamento das condições microbiológicas deste ambiente marinho, devendo-se escolher alguns grupos bacterianos que indiquem qualitativa e quantitativamente condições de salubridade das águas marinhas que recebem efluentes domiciliares, visando neste caso à pesquisa de microrganismos patogênicos (VIEIRA ET. AL., 1996 APUD PINHEIRO ET. AL., 2002). Mesmo tendo relatado e atestado o tratamento da dejeção do esgoto sanitário e a qualidade microbiológica das águas no entorno portuário de Santos, Paranaguá e Recife. Estas regiões sugerem tratar-se de ambientes antropizados e impactados sobremaneira, ao observamos que espécimes concentradores de moluscos bivalves coletados concentraram microrganismos indicadores de poluição fecal existente na água circundante dos bancos naturais onde estavam localizados.

Normalmente, a metodologia utilizada para o isolamento do gênero bacteriano *Salmonella* é demorada e depende de certos critérios, como temperatura e tempo de incubação dos meios seletivos, e do número de meios selecionados para identificação além das diferentes etapas como pré-enriquecimento, enriquecimento em caldos seletivos e meios sólidos seletivos específicos (NASCIMENTO et al., 2000). Além do mais, na literatura especializada, há uma grande variedade de indicações metodológicas para o isolamento e identificação de células de *Salmonella* de origem alimentar e clínica, contudo uma metodologia adequada para seu isolamento em ambiente marinho não é comum. Dentre os meios seletivos contemplados para isolamento de *Salmonella*, o meio BSA é indicado para amostras das diversas origens, enquanto HEK é utilizado mais qualificadamente em amostras de origem alimentar e clínica (FDA/CFSAN, 2003). Os meios seletivos diferenciais favorecem a multiplicação de células de *Salmonella* presentes, porém seu isolamento pode ser comprometido pela concorrência com outras enterobactérias, que também crescem nos meios de cultivo utilizados. O isolamento de *Salmonella* não depende do meio seletivo utilizado, mas da concentração destes microrganismos e do tipo de amostra analisada com

relação com a presença dos microrganismos entéricos competidores existentes na amostra (FLOWERS et al., 1992; WRAY & DAVIES, 1994; ARROYO & ARROYO, 1995; JUNE et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2000).

Nesse trabalho, foram utilizados diversos meios de enriquecimento e seletivos na tentativa de otimizar o isolamento de *Salmonella*. Assim, dentre amostras de origens variadas, o caldo Rapport-Vassiliadis e o Ágar Bismuto Sulfito foram os melhores com relação ao isolamento das cepas de *Salmonella* nos tipos de amostras analisadas.

Agentes antimicrobianos são adotados de forma essencial para cuidados com a saúde humana e animal. Usados em diferentes ambientes e com diferentes propósitos para prevenir ou curar, estes agentes são frequentemente os mesmos ou muito proximamente relacionados aos antimicrobianos prescritos. Fato que vem impulsionando o surgimento de cepas com múltipla resistência a agentes microbianos, conceituando um problema de saúde pública mundial (FAO/OIE/WHO, 2003). Cepas de *Salmonella*, incluindo cepas resistentes, podem ser encontradas no ambiente aquático como resultado da contaminação dos ambientes de atividade humana, animal e agrícola (FAO/OIE/WHO, 2006).

Evidências circunstanciais demonstram que o fato de cepas bacterianas possuindo marcadores de resistência relacionados pode ser explicado pela ocorrência de conjugação em diversos ambientes naturais bem como no trato gastrointestinal de humanos e animais (OGUNSEITAN, 1995). Sugerindo que cepas multiresistentes podem ter a mesma origem e consequentemente serem patogênicas tanto em organismos aquáticos quanto em infecções humanas (FURUSHITA et al., 2003).

Tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos, o problema das infecções por salmonelas deve-se a ocorrência de cepas multirresistentes a drogas. Este fato está alarmando pelo seu alto potencial de envolvimento humano através do alimento e/ou contato por manipulação de animais (NASTASI and MAMMINA, 2001; LOUREIRO, 1990).

O ensaio utilizou quatorze drogas de diferentes espectros, 197(95,6%) apresentaram antibióticotipos de resistência (1 ate 10 antibioticos) entre as

cepas isoladas de amostras de água e 100% das cepas isoladas de bivalves (resistência a 1 até 5 antibióticos).

S. Livingstone, no porto de Santos apresentou resistência a 10 antibióticos (CTX AMP CRX KAN AMI CIP PPT AMC CAZ ATM) em 21,8% dos isolados de água da região portuária.

No porto Paranaguá, cepas com o sorotipo *S. Lille* apresentaram fenótipo de resistência à (nove) dos quatorze agentes testados (7,3%), incluindo resistência ao florfenicol e cloramfenicol (**FLF/CLO**), o mesmo fenótipo de resistência a **FLF/CLO** foi observado em quatro cepas de *S. Typhimurium* isolada em amostra de bivalve em Santos e em quatro cepas de *S. Panama* isoladas em água em no porto Belém. O **FLF** é um agente antimicrobiano pesquisado desde o início dos anos 80 para terapia de pseudotuberculose, uma doença comum em peixes na Ásia, cujo agente etiológico é *Pasteurella piscicida* (*P. piscicida*). E desde então foi introduzido em atividades de aquicultura para prevenção da doença entre a população de peixes confinada em tanques de criação (SØRUM, 2006). Por se tratar de um agente para uso veterinário e atividades específicas seu uso no Brasil, ainda é pouco difundido e principalmente, em se tratando o local de coleta de água e moluscos bivalves ser uma região portuária, intriga o aparecimento de cepas de *Salmonella enterica* com esta característica é bastante surpreendente.

Cepas de *Salmonella* consideradas multirresistentes a agentes antimicrobianos, apresentam perfil marcado a até 8 antimicrobianos testados e estão mundialmente associados ao sorotipo Typhimurium identificados como DT (definitive type) 104, evidenciado em países como Espanha, França, Dinamarca, Estados Unidos, Grécia, Ásia e Itália como a principal causa de surtos de origem alimentar (NASTASI and MARMMINA, 2001; HELMS et al., 2002; DOUBLET et al., 2003; ZHAO et al., 2003; MARTINEZ-UTARZA et al., 2004 [a, b]; HSUEH et al., 2004; VARMA et al., 2005; POLITI et al., 2005). Amostras de bivalve coletadas em bancos naturais do litoral de São Paulo, Florianópolis e Porto Alegre isolaram 12 cepas identificadas do sorovar Typhimurium resistentes a sete antimicrobianos (LOPES et al., 1979). Infecções humanas causadas por *S. Typhimurium* demonstram 95,8% em multirresistência em 5 até 16 antimicrobianos, enquanto provenientes de outras

origens foram 85% resistentes a 5 ou mais antimicrobianos, como consequência da pressão seletiva e continua na propagação de cepas resistentes que colonizam estes ambientes (PESSOA ET. AL., 1980; SOLARI ET. AL., 1986; FERNANDES ET. AL., 1992).

No nosso trabalho *S. Typhimurium* foi isolado somente em amostras de ostras das áreas portuárias de Recife e Santos correspondendo a 62,5% dos sorotipos encontrados. Os mesmos foram resistentes a 04 e 05 antibióticos, sendo que 50% possuíam o perfil de resistencia AMC CAZ ATM CLO FLF.

O sorotipo *Typhimurium* frequentemente está associado com isolados das infecções humanas em episódios de surtos diarreicos, enquanto demais sorovares aqui identificados como, Livingstone, Panama e Saintpaul, comumente referem-se a isolados não humanos (UTARZA-MARTINEZ et. al., 2004 [a]). Em 12 cepas caracterizadas como *S. Typhimurium*, em um estudo com amostras de bivalve coletadas em bancos naturais do litoral de São Paulo, Florianópolis e Porto Alegre mostrou que estas possuíam um antibióticotipo de resistência a sete agentes antimicrobianos dentre os quais kanamicina e ácido nalidíxico (LOPES et. al., 1979). Estudos sobre a resistência aos agentes antimicrobianos demonstram que a grande maioria das cepas isoladas de infecções humanas são multirresistentes, 95,8% de cepas de *S. Typhimurium* isoladas deste tipo de infecção foram resistentes para 5 até 16 antimicrobianos enquanto provenientes de outras origens do próprio ambiente hospitalar cerca de 85% foram resistentes até 5 ou mais antimicrobianos (FERNANDES et. al., 1992), consequência da pressão seletiva e continua na propagação de cepas resistentes que colonizam estes ambientes (PESSOA et al., 1980; SOLARI et al., 1986).

O esquema de sorotipagem para *Salmonella* spp. descrito por KAUFFMANN-WHITE reconhece através do antígeno somático (O) 46 sorogrupos, os quais junto com a detecção do antígeno flagelar (H) fornecem a fórmula antigênica do microrganismo para identificação do sorotipo. O alicerce da sorotipagem de *Salmonella* tem se tornado a base para confeccionar métodos de detecção molecular (FITZGERALD et al., 2003). A cadeia polissacarídica O, que é um dos compostos da estrutura química do LPS é bem identificada em *Salmonella*, formada pela polimerização de unidades de repetição, variando entre três e seis açúcares que são antigenicamente muito variáveis, tal

variabilidade permite a base da classificação sorológica usada como reconhecimento dos principais sorogrupos patogênicos de *Salmonella* denominado de *rfb* (LUK et al., 1993).

Noventa e quatro cepas de *Salmonella enterica* isoladas entre amostras de água e molusco bivalve, estavam relacionadas aos principais sorogrupos patogênicos A/D1, B e C2-C3, destas 88 (41,1%), confirmaram pertencerem aos sorogrupos entéricos de *Salmonella*, que são ubiqüitários e causam tanto doenças humanas quanto em animais, através da utilização da ferramenta molecular do grupo genético *rfb*. Os resultados obtidos forneceram uma ferramenta rápida de caracterização de sorogrupos patogênicos A/D1, B e C2-C3, auxiliando programas de vigilância epidemiológica no rastreamento dos principais grupos sorológicos envolvidos nas infecções de *Salmonella* subespécie I.

A FAO/WHO iniciou a avaliação do risco na associação alimento-patógeno *Salmonella* em carcaças de frango e (ovos) utilizando o ambiente de criatório animal como modelo para traçar um perfil da possível contaminação e exposição do humano em 2002, de acordo com a FAO/WHO análise de risco microbiológico é um processo científico que consiste das seguintes etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, exposição ao risco, relação dose-resposta e caracterização de risco (FAO/WHO, 2002).

Seguindo o conceito apresentado, pretendeu-se avaliar a presença de *Salmonella* no ambiente marinho portuário como modelo de representação de perigo microbiológico, mesmo que esta área não seja para fins recreacionais ou cultivo de moluscos bivalves. Uma vez que os dados mostrados no presente estudo, demonstraram a presença de cepas de *Salmonella enterica* com perfil de multiresistência a até 10 agentes antimicrobianos em quatro de sete regiões portuárias e em 04 de 21 espécimes de moluscos bivalves coletados em regiões próximas de seu entorno, comprovando que 88 destas cepas continham seqüências semelhantes ao grupo genético *rfb* albergado dentre os principais sorogrupos patogênicos de *Salmonella enterica*.

Uma análise dos riscos deverá ser aplicada estabelecendo programas de vigilância epidemiológica das áreas portuárias considerando, uso da água e transporte via lastro com possibilidade de deslastre em áreas recreacionais e de malacocultura, principalmente pelo hábito confirmado nas regiões brasileiras do consumo de moluscos bivalves “in natura” regiões brasileiras, desenhando programas em vigilância ambiental, sanitária e epidemiológica.

ANEXO I - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA *rfb* UNIPLEX PCR (SAMBROOK ET. AL., 1989).

1. Solução Tris Acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-Base (Sigma)	242 g
Acido Acético Glacial (Merck)	57,1 mL
Água Ultrapura q.s.p	1000ml

2. Loading Buffer (Tampão de Amostra)

50% Glicerol

0,4% de Azul de Bromofenol

0,4% de Xileno Cianol

1mM EDTA

3. Solução Corante de Brometo de Etídio (10 mg/mL)

Brometo de Etídio	1 g
Água Ultrapura q.s.p	100mL

REFERENCIAS

ALMEIDA, I.A.Z.C. ET AL. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 _ 1999. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 2000; 59:33-37.

American Public Health Association. Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th ed. APHA, Washington, DC., 1985.

ANDERSON IC, RHODES MW, AND KATOR HI. Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and nonfiltered stuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983;45: 1877-1883.

ANGULO F, JOHNSON KR, TAUXE RV & COHEN ML. Origins and consequences of antimicrobial resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Mic. Drug Resist.* 2000;6:77-83.

ANVISA/ANVS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Ministério da Saúde. PORTARIA 451/22/9/199 revogada por Resolução-RDC No. 12, de 2/01/2001. Diário Oficial da Republica Federativa da União, Brasília, 10 de Janeiro de 2001.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC INTERNATIONAL, Arlington, VA., 1995.

BARON, S. Medical Microbiology 2000. Available online from [www//gsbs.utmb.edu/microbook/](http://gsbs.utmb.edu/microbook/) accessed on 11/2002.

BAUDART J, LEMARCHAND K, BRISABOIS A AND LEBARON P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(4): 1544-1552.

BAUER AW AND KIRBY WMM. Antibiotic Suscetibility Testing by a Standardized Single Disk Method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45(1):493-496.

BESSA MC, COSTA M, CARDOSO M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 2004; 24:80-84.

BORMAN EK, STUART CA. & WHEELER K. Taxonomy of the family. *J Bacteriol.* 1944;**48**:351-367.

BRANDS DA, INMAN A E, GERBA C P, MARÉ CJ, BILLINGTON SJ, SAIF LA, LEVINE JA, AND JOENS LA. Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. *Appl. and Environmental Microbiology.* 2005; 71:2: 893-97.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Serviço de Inspeção de Produtos Animais. SERPA- SC. Informação DIPES no 097/88, Brasília -DF, 1988.

BRENNER FW, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R, SWAMINATHAN B. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(7): 2465-2467.

BUXTON A, FRASIER G. *Animal Microbiology.* London: Blackwell Scientifc Publ. 1977.

CARMO GMI, ALVES R M, DE ALMEIDA MG, DIMECH CPN, OLIVEIRA AA, CARMO EH. Perfil Epidemiológico dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS / Ministério da Saúde – MS. In: http://www.cbmvha.org.br/publicacoes/perfil_epidemiologico.doc acesso 02/2007.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Surtos de doenças notificados transmitidos por alimentos. Available online from http://www.cve.saude.sp.gov.br/htmDTA_TAB201.htm assessed on 08/2003

CLARK RM et.al. Tracking a Salmonella serotype typhimrium outbreak in Gideon, Missouri: role of contaminants propagation. J. Water SRT-Aqua. 1996;45: 171-183.

CLESCERL LS, GREENBERG AE, EATON AD. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) [Hardcover]. 18th Ed. 1992; p 9-14.

Diário Oficial da Republica Federativa da União, Brasília, 10 de Janeiro de 2001.

DISCIPLINA DE ESTUDO EM RECURSOS HÍDRICOS. Disciplina oferecida pela faculdade de Saúde Pública – USP em convenio com CETESB de Agosto a Novembro de 2002; apostilas números 3 e 4.

DOUBLET B, LAILLER R, MEUNIER D, BRISABOIS A, BOYD D, MULVEY MR, CHASLUS-DANCLA E, AND CLOECKAERT A. Variant Salmonella Genomic Island 1 Antibiotic Resistance Gene Cluster in Salmonella enterica Seroovar Albany. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9:5.

EUZEBY JP. Salmonellae and aviary salmonellosis due to ubiquitous serovars. REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE. 1997; 1: 61-76.

FARIAS EWC. Pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp. e Salmonella spp. em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo. Tese Mestrados – apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1997; 98p.

FAO/WHO RISK ASSESSMENTS OF SALMONELLA IN EGGS AND BROILER CHICKENS - MICROBIOLOGICAL RISKS SERIES. Interpretative Summary, p.xv, 2002.

FAO/OIE/WHO. Organization International des Epizooties (World Organisation for Animal Health), World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004a. Joint FAO/OIE/WHO Expert

Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Proceedings. p. 41. Geneva, 1-5 December 2003.

FAO/OIE/WHO. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance: Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance Seoul, Republic of Korea. p. 107. 13–16 June 2006.

FARMER III (J.J.): Correction of four specific epithets that are hyphenated in the Approved Lists of Bacterial Names 1980. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983;33: 425.

FEACHEM RG, BRADLEY DJ, GARELICH H, MARA DD. Sanitation and Disease: health aspects of excreta and wastewater management. New York: John Wiley. 1983; p.501 (World bank in studies in water supply and sanitation, 3).

FERNANDES SA, TAVECHIO AT, NEME SN, CALZADA CT, DIAS AMG, NAKAHARA LK, DEOLIVEIRA JC, IRINO K, TAUNAY AE. Epidemiologic markers of salmonella-typhimurium and salmonella-agona. *Revista do instituto de medicina tropical de Sao Paulo*. 1992; 34:2: 91-98.

FERNANDES S A, TAVECHIO AT, GHILARDI ÂCR,; DIAS ÂMG, et al. *Salmonella* Serovars Isolated from Humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. 2006; 48(4):179-184.

FITZGERALD C, SHERWOOD R, GHEESLING LL, BRENNER FW, AND FIELDS PI. Molecular Analysis of the rfb O Antigen Gene Cluster of *Salmonella enterica* Serogroup O:6,14 and Development of Serogroup-Specific PCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(10):6099-6105.

FORSHELL LP, WIERUP M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE-OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES*. 2006; 25:2: 541-554.

FRANCO BDGM, LANDGRAF, GM. Microbiologia dos Alimentos. Editora Atheneu/ São Paulo. 1996; 55.

FUNASA IMPRENSA. Available online from [http:// www.funasa.gov.br/](http://www.funasa.gov.br/) assessed on 11/2005.

GALANIS E,* DANILO MA, LO FO WONG, MARY E, et al,. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution. World Health Organization Global Salm-Surv. 2001-2002. 2006; 12: 381-388.

GRAY JT, FEDORKA CPJ, STABEL TJ, ACKERMANN MR. Influence of infection on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. Vet Microbiol. 1995; 47:43-59.

GREENBERG AE, CLESCERI LS, EATON AD. Standard Methods. For the examination of water and wastewater. 18TH edition. APHA/AWWA/WEF. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. ISBN. 1992; 0-87553-207-1.

GREENBERG AE, CLESCERI LS, EATON AD. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1992; 18:9-45.

GROISMAN AE, BLANC-POTARD AB, UCHIYA K. Pathogenicity islands and the evolution of *Salmonella* virulence in: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. American Society for Microbiology(ASM), Washington, DC. 1999; 7:127-150.

HEINITZ ML, AND JOHOSON JM. The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. J. Food Prot. 1998; 61:318-323.

HELMS M, VASTRUP P, GERNER-SMIDT P, AND MØLBAK K. Excess Mortality Associated with Antimicrobial Drug-Resistant *Salmonella* Typhimurium. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 5.

HERIKSTAD Y, MOTARJEMI AND TAUXE RV. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping, Epidemiol. Infect. 2002; 129:1–8.

HOFER E, COSTA GA. Investigação sobre a ocorrência de Salmonella em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. OswaldoCruz. 1972; 70:221-236.

HOFER E, REIS EMF. Salmonella serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1994; 36:7-9.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro. 1997;17:2:55-62.

HOFER, E. ; SILVA FILHO, S. J. ; REIS, E. M. F. . Sorovares de Salmonella isolados de matérias primas e de ração para aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, Brasil. 1998; 18:21-27.

HOFER E, ZAMORA M R N, LOPES A E, MOURA AM, ARAÚJO HL, LEITE JD AD, LEITE MDD, SILVA FILHO SJ. Sorovares de Salmonella em carne de eqüídeos abatidos no nordeste do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2000; 20: 80-84.

HSUEH PR, TENG LJ, TSENG SP, et al,. Ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica Typhimurium and Choleraesuis from pigs to humans, Taiwan. Emerg Infect Dis. 2004;10: 60–68.

http://www.cve.saude.sp.gov.br/htmDTA_TAB201.htm assessed on 08/2003

[http:// www.funasa.gov.br/](http://www.funasa.gov.br/) assessed on 11/2005

<http://portalweb02.saude.gov.br/portal/> assessed on 07/2005

<http://www.ministeriodaagricultura.gov.br/> assessed on 11/2005

KAMPELMACHER EH. Spread and significance of Salmonellae in surface waters in Netherlands. ASTM-STP635. Edited by A.W. Hoadley and B.J. Dutka. American Society for Testing and Materials Philadelphia. 1977; 148-158.

KAUFFMANN F. Kauffmann-White schema. In: Serological diagnosis of *Salmonella* species. 1st ed. Copenhagen, Williams & Wilkins. 1972; 59-123.

KAUFFMANN F, REUL R. New salmonella types from the belgian congo. ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA. 1949; 26: 2: 335-336.

KAUFFMANN F, JANSSENS PG. A new salmonella type (s-tinda) from the belgian congo. ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA. 1949; 26: 5: 719-719.

KAUFFMANN F, VANOYE E, VANDEPITTE J. New salmonella types from the belgian congo. ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA. 1949; 26: 2: 337-338.

KILLALEA D, WARD LR, ROBERTS D, DE LOUVOIS J, SUFI F, STUART JM, et al. International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella agona* infection from a ready to eat savoury snack. I. England and Wales and the United States. 1996; 313:1105-1107.

KIM EH AND AOKI T. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. Microbiol. Immunol. 1994;40:665-669.

KRAMER MH, HERWALDT BL, CRAUN GF, CALDERON RL, JURANEK DD. Surveillance for waterborne-disease outbreaks, United States, 1993-1994. J. Am. Water Works Assoc. 1996; 88: 66-80.

LAZARO NS, TIBANA A, RODRIGUES DP, REIS EMF, QUINTAES BR AND HOFER E. Antimicrobial Resistance and R-plasmid in *Salmonella* spp. from Swine and Abattoir Environments. *Pesq. Vet. Bras.* 2004;24:2: 57-60.

LEAL NG, SA A Y, SOLARII CA, SILVA SJ, HOFER E. Sorotipos de *Salmonella* Isolados de Processos Entericos Humanos em Recife, Pernambuco, durante o Triênio 1978 1980. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987;82:1: 43-49.

LE MINOR L. Antigen conversions in salmonella .x. study of a new converting phage modifying antigen o structure of strains of group c. *ANNALES DE L INSTITUT PASTEUR.* 1968; 114: 1: 49.

LE MINOR L, VÉRON M, POPOFF M.. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 1982; 133 B, 223-243 and 245-254.

LE MINOR L. *Salmonella*. In: Krieg, N.R. and J.G., Hort (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 8 ed. Baltimore/London. Williams & Wilkins. 1984; 2:427-458.

LE MINOR L, POPOFF MY, LAURENT B, HERMANT D. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 1986, 137 B, 211-217.

LEMINOR L, POPOFF MY. Designation of *salmonella-enterica* sp-nov, nom rev, as the type and only species of the genus *salmonella*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.* 1987; 37: 4: 465-468.

LOPES CAM, MORENO G, WATANABE DAS, CONCEIÇÃO AH. Isolamento de *Salmonella* em moluscos marinhos. *Arq. Inst. Biol. São Paulo.* 1979; 46(3/4): 103-106.

LOUREIRO ECB. Contribuição ao estudo bacteriológico de *Salmonella* oriundas de diferentes fontes da região amazônica brasileira. Tese Mestrado – apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1990; 102.

LUK JMC, KONGMUANG U, REEVES PR, LINDBERG AA. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (rfb) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B,C2, and D). *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. 31(8): 2118-2123.

MARTINS MT. *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. Tese de Doutorado - apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1979; 354.

MARTINS MT, SANCHEZ PS, SATO MI.Z, BRAYTON PR, COWELL RR. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy. *Word J. Microbiol. Biotechnol*. 1988; 9:390-392.

MARTINEZ-URTAZA J, SACO M, HERNANDEZ-CORDOVA G., et al. Identification of *Salmonella* serovars isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. **J. Food Protect.** 2003; 66: 226-232.

MARTINEZ URTAZA J, LIEBANA E, GARCIA-MIGURA L, PEREZ-PIÑEIRO P, et al. Characterization of *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium from Marine Environments in Coastal Waters of Galicia (Spain). **Appl. Environ. Microbiol.** 2004; 70: 4030-4034.

MARTINEZ URTAZA J, SACO M, DE NOVOA J, ET AL. Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 2004; 70: 2089-2097.

MEAD PS, SLUTSKER L, DIETZ V, MCCAIG L F, et al,. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infections Diseases*. 1999; 5:607-625.

MELO MT, VIEIRA RH, SAKER-SAMPAIO S, HOFER E. Coliforms and Salmonella in seawater near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceara, Brazil). Microbiologia. 1997; 13:463-70.

MENEZES FG, EVANGELISTA-BARRETO NS, VIEIRA RHSF. Ocorrência de Salmonella spp. isoladas de ostras em criadouro natural. Oitavo Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA) de 24-28 de Novembro. Rio de Janeiro. 2002.

MILLEMANN Y, LESAGE-DESCAUSES MC, LAFONT JP, CHASLUS-DANCLA E. Comparision of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of Salmonella. FEMS Immunology nd Medical Microbiology. 1996; 14: 129-134.

MILLER SI, HOHMANN EL, PEGUES DA. Principles and practice of infectious diseases. In: Mandell GL, Bennett LE, Dolin R, eds. Salmonella. New York: Churchill Livingstone, 1995; 2013:33.

MINISTÉRIO DA SAÚDE GOVERNO FEDERAL DO BRASIL. Available online from <http://portalweb02.saude.gov.br/portal/> assessed on 07/2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA GOVERNO FEDERAL DO BRASIL. Available online from <http://www.ministeriodaagricultura.gov.br/> assessed on 11/2005.

MORSE EV & DUNCAN M.A. Salmonellosis an environmental health problem. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1974;165:1015-1019.

NASCIMENTO MS, BERCHIERI JR A, BARBOSA MD, ZANCAN FT, ALMEIDA WAF. Comparação de Meios de Enriquecimento e de Plaqueamento Utilizados na Pesquisa de Salmonella em Carcaças de Frango e Fezes de Aves. Rev. Bras. Cienc. Avic. 2000;2:1.

NASTASI A, MAMMINA C. Presence of Class I Integrons in Multidrug-Resistant, Low Prevalence *Salmonella* Serotypes, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(3):455-458.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Villanova (PA):The Committee, 2005.

NG MULVEY M, MARTIN I, PETERS GA AND JOHNSON W. Genetic characterisation of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:3018–3021.

NORMALIZAÇÃO TÉCNICA CETESB (L5.218). Método semi-quantitativo para o isolamento e identificação de *Salmonella* em água e esgoto.

O'BRIEN SJ AND DE VALK H. *Salmonella* “old” organism, continued challenges!, *Euro Surveill.* 2003;8:29–31.

POLITI et al. Repeated Occurrence of Diverse Extended-Spectrum {beta}-actamases in Minor Serotypes of Food-Borne *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:3453-3456.

POPOFF MY, LE MINOR L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 7th Revision. WHO Collaborative Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Inst. Pasteur, Paris, France. 1977.

POPOFF MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th Revision. WHO Collaborative Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris. Inst. Pasteur. 2001.

POPPE C, SAEED M, GAST RK, POTTER ME ET AL,. *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis in Humans and Animals Epidemiology, Pathogenesis, and Control, Iowa State Press, Ames, IA. 1999;3-18.

PORTARIA 451/22/9/199 revogada por Resolução-RDC No. 12, de 2/01/2001.

REEVES MW, EVINS GM, HEIBA AA, PLIKAYTIS BD, FARMER JJ. Clonal nature of salmonella-typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of salmonella-bongori comb nov. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1989; 27: 2: 313-320.

REEVES P, STEVENSON G. Cloning and nucleotide-sequence of the salmonella-typhimurium It2 gnd gene and its homology with the corresponding sequence of escherichia-coli-k12. MOLECULAR & GENERAL GENETICS. 1989; 217: 1: 182-184.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 274/2000 - "Revisa os critérios de Balneabilidade em Águas Brasileiras" - Data da legislação: 29/11/2000 - Publicação DOU: 08/01/2001.

RISTORI AC. Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Pulo. São Paulo. 2000.

RISTORI AC. Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. Tese Mestrado - apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Pulo. São Paulo. 2000.

RISTORI, C; IARIA, ST; DELLI D, et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. Int. J. Environ. Health Res. 2007; 17:1-11.

RIVERA NGI, MARTINS MT. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. Rev. Ciênc. Farm. São Paulo. 1996; 17:115-136

RODRIGUES DP, SOLARI CA, RIBEIRO RV, COSTA JECM, REIS EMF, SILVA-FILHO SJ, HOFER E. Salmonella em águas de praias do município do Rio de Janeiro, RJ. Rev. Microbiol. 1989;20:12-17.

RUIZ J et. al. Systemic infections in three infants due to lactose-fermenting strain of Salmonella virchow. Eur. J. Clin. Microbiol. 1995;14: 454-456.

SAKER L, LEE K, CANNITO B, GILMORE A, CAMPBELL-LENDRUM D. GLOBALIZATION AND INFECTIOUS DISEASES: A REVIEW OF THE LINKAGES. TDR/STR/SEB/ST IN: WORD HEALTH ORGANIZATION. 2004; 153.

Sambrook J. Fristsch EF Maniatis T Molecular cloning: a laboratory manual. Section 12: Detection art analysis of proteins expressed from cloned genes, Prainview. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANCHEZ PS. Sorotipos de Salmonella em agues de esgoto e perfil de resistência a antimicrobianos. Tese Doutorado – apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1988; 229.

SAYLER GS, NELSON JD, JUSTICE A, COLWELL RR. Incidence of Salmonella spp., Clostridium botulinum and Vibrio parahaemolyticus in an estuary. Appl. Environ. Microbiol. 1976; 31:5:723-730.

SCHEIL W, CAMERON S, DALTON C, MURRAY C, VILSON D. A South Australian Salmonella Mbandaka outbreak investigation using database to select controls. Australian Journal of Public Health 1998; 22:536-

SCUDERI G. Epidemiology of Salmonella enterica serovar Enteritidis infections in Italy. Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals.

Epidemiology, pathogenesis, and control. Iowa State University Press, Ames. In A. M. Saeed, 1999; 111-115.

SILLIKER JH. The Salmonella Problem: current status and future direction. J. Food Prot. 1982;45: 661-666.

SILVA EA. Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação. 6º Edição. Livraria Varela. 2005;104-136.

SØRUM, H. Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal origin, editor F. Aarestrup. ASM Press. Washington DC, USA. 2006.

STANLEY J, BAQUAR N, THRELFALL EJ. Genotypes and phylogenetic relationships of Salmonella typhimurium are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16S rrn loci. J. Gen. Microbiol. 1993;139:1133-1140.

TAUNAY AE, FERNANDES SA, TAVECHIO AT et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 1996;38: 119-127.

TAVECHIO AT, FERNANDEZ AS, NEVES BC, DIAS AMG, IRINO K. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella enteritidis in São Paulo, Brazil. Rev.Inst. Med. Trop. 1996;38:5:315-322.

TILLOTSON CJ, SAVAGE MD, SALMAN CR, GENTRY-WEEKS D, RICE PJ, FEDORKA-CRAY DA, et al,. Outbreak of Salmonella infantis infection in a large animal veterinary teaching hospital, J. Am. Vet. Med. Assoc.1997;211:1554–1557.

USERA MA, CANO R, ECHEITA A. Análisis de los serotipos de Salmonella spp aislados en España en el periodo 1988-1992. Enf. Inf. Microbiol. Clin. 1995; 13: 138-145.

UZZAU S, BROWN DJ, WALLIS T, RUBINO S, LEORI G, BERNARD S, CASADESUS J, PLATT DJ, OLSEN JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *EPIDEMIOLOGY AND INFECTION*. 2000; 125: 2: 229-255.

VALENTINI SR, LEITE CQF, FALCÃO DP. Serotypes and virulence of *Salmonella* sp. Isolated from fresh water. *Rev. Microbiol.* 1995; 26:1:37-40.

VARMA JK, MØLBAK K, BARRET T J, JONES J. F, RABATSKY-EHR T, SMITH K E, VUGIA DJ, CHANG HGH, ANGULO FJ. Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J. Infect. Dis.* 2005; 191.

VERMA N, REEVES P. Identification and sequence of *rfbS* and *rfbE*, which determine antigenic specificity of group A and group D *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology*. 1989; 171:5:694-5701.

VIEIRA F, EVANGELISTA NSS, RODRIGUES DP. Colimetria das águas marinhas de Fortaleza (Ceará, Brasil) e detecção de cepas de *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC) e Enteropatogênica Clássica (EPEC). *Arq. Ciênc. Marinha*. 1996;30:27-31.

VIEIRA RHSF, RODRIGUES DP, MENEZES EA, EVANGELISTA NSS, REIS EMF, BARRETO LM, GONÇALVES FA. Microbial Contamination of Sand from Major Beaches in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 2001;32:77-80.

WIGGINS BA, CASH PW, CREAMER WS, SCOTT E, et. al. Use of Antibiotic Resistance Analysis for Representativeness Testing of Multiwatershed Libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69: 3399-5803.

WILSON IG, AND MOORE JE. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 1996;116:147-153.

WOOD PC. Guide to shellfish hygiene. World Health Organization offset publication no. 31. World Health Organization, Geneva. 1976.

WRAY C.I.M. & R.H. DAVIES. Guidelines on detection and monitoring of Salmonella infected poultry flocks with particular reference of *S. enteritidis*. In: Bulletin of Who, Zoon/94. 1994; 48.

ZHAO S, DATTA AR, AYERS S, FRIEDMAN S, WALKER RD, WHITE DG. Antimicrobial-resistant Salmonella serovars isolated from imported foods. Int. J. Food Microbiol. 2003;84: 87-92.

ZOBELL CE, AND FELTHAM CB. Bacteria as food for certain marine invertebrates. J. Mar. Res. 1938;1: 312-327.

WALL PG AND WARD L R. Epidemiology of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage type 4 in England and Wales. Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals. Epidemiology, pathogenesis, and control. Iowa State University Press, Ames. In A. M. Saeed (ed.). 1999;19-25.

WILSON IG, MOORE JE. Presence of Salmonella spp. and Campylobacter spp. in shellfish. Epidemiol. Infect. 1996; 116:147-153.

ZHAO S, DATTA AR, AYERS S, FRIEDMAN S, WALKER RD AND WHITE DG. Antimicrobial-resistant Salmonella serovars isolated from imported foods, Int. J. Food Microbiol. 2003; 84:87–92.