

Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará — Nota prévia

Renata Albuquerque COSTA¹
 Gustavo Hitzschky Fernandes VIEIRA¹
 Giselle Cristina SILVA¹
 Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA²
 Silvana Saker SAMPAIO³

1 - Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-CE

2 - Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE

3 - Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza-CE

Correspondência para:
 Rua Dr. Monte, 1207, Centro, Sobral – Ceará, 62011-200; renata.albuq@gmail.com

Recebido para publicação: 19/12/2006
 Aprovado para publicação: 07/03/2008

Resumo

Foram feitos ensaios de susceptibilidade a antibióticos em 48 cepas de *Vibrio* isoladas do cultivo do *Litopenaeus vannamei* no Ceará. Para os testes de difusão foram utilizados 11 antibióticos. A espécie que apresentou maior percentagem de resistência aos antimicrobianos foi *V. cholerae*, onde 33,33% das 12 cepas testadas mostraram-se resistentes a sulfazotrim, 25% a ampicilina e 33,33% a ceftriaxona.

Palavras-chave:

Susceptibilidade a antibióticos. *Vibrio*.

Litopenaeus vannamei.

A rápida expansão do cultivo de peneídeos está sendo ameaçada por doenças provocadas por espécies de *Vibrio*, que afetam a sua sobrevivência e crescimento. Estes microrganismos oportunistas fazem parte da microbiota normal dos peneídeos, provocando doenças quando condições ambientais desfavoráveis se estabelecem nos sistemas.¹ De acordo com Gámez et al.², as espécies do gênero *Vibrio* associadas a infecções em camarão têm a propriedade de interferir nos estágios de seu desenvolvimento, provocando mortalidade de até 100% após 24 horas do aparecimento da infecção.

O emprego de antibióticos no tratamento de patologias bacterianas na aqüicultura mostra-se limitado devido a sua relativa eficácia e possível desenvolvimento de cepas resistentes, alterando a microbiota das áreas afetadas. Abraham³ relata a resistência múltipla de *V. harveyi*, isolado do cultivo de larvas de peneídeo, a cloranfenicol, eritromicina, neomicina, estreptomicina, sulfaziadina e trimetropim. De acordo com Moriarty⁴, na Ásia e América Latina, as fazendas de camarão

utilizam antibióticos em larga escala, incluindo fluoroquinolonas como a sarafloxacin, norfloxacin e enrofloxacin, sendo difícil se determinar o uso total anual, mas estima-se o uso de aproximadamente 1.000 a 2.000 T/ano. Este uso selecionará bactérias resistentes nos dejetos da fazenda que, por sua vez poderá contaminar as águas costeiras, e influenciando a saúde humana.

O aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambientes de produção animal e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos.⁵ A contaminação dos alimentos de origem animal durante o abate e processamento é considerada a principal via para o carregamento de bactérias resistentes aos antibióticos para os seres humanos.^{5,6}

Os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate de doenças humanas e de animais aquáticos cultivados. Entretanto, o seu uso indiscriminado pode provocar transferência da resistência à droga a patógenos humanos, modificação na microbiota de consumidores

devido aos antibióticos presentes no alimento e toxicidade de alguns deles aos manuseadores de animais.⁷

Hofer et al.⁸ afirmam que a resistência múltipla aos antimicrobianos em *V. cholerae* não é um fato inusitado. Em estudo sobre a resistência múltipla deste microrganismo isolado em pacientes com gastroenterite no Ceará - Brasil, os mesmos autores isolaram amostras de *Vibrio* de 7.058 pacientes com suspeita de síndrome coleriforme, no período de 1991 a 1993. Das cepas isoladas, duas apresentaram características de múltipla resistência aos antimicrobianos tetraciclina, ampicilina, eritromicina e sulfametoxazol-trimetoprima.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade a antibióticos de estirpes de *Vibrio* isoladas de amostras de água de captação, água do viveiro e camarão de uma fazenda de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no litoral oeste do Estado do Ceará.

As colônias de *Vibrio* spp foram isoladas de amostras de água de captação, água do viveiro e camarão de uma fazenda de camarão marinho localizada no estuário do rio Coreaú, litoral oeste do Estado do Ceará, no período de maio a novembro de 2005. As metodologias de isolamento e identificação de estirpes de *Vibrio* seguiram de acordo com Downes e Ito⁹. As colônias foram submetidas à coloração de Gram e aos testes de motilidade, oxidase, produção de indol, Vogues-Proskauer, tolerância ao NaCl 0%, 3%, 6%, 8% e 10% em água peptonada a 1%, fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, glicose, arabinose e manose), descarboxilação de aminoácidos (lisina e ornitina), hidrólise da arginina, produção de gás a partir de glicose, hidrólise do o-nitrofenil â-D-galactopiranosídeo (ONPG) e triagem em agar tríplice açúcar ferro (TSI).

Foram realizados ensaios de susceptibilidade a antibióticos de 48 estirpes de *Vibrio*, sendo 14 isoladas das amostras de água de captação, 16 isoladas dos viveiros e 18 isoladas de amostras de camarão. Das 48 colônias isoladas foram identificadas as

seguintes espécies *V. cholerae* (12), *V. fluvialis* (6), *Vibrio* spp (6), *V. harveyi* (5), *V. parahaemolyticus* (4), *V. mimicus* (5), *V. cincinnatiensis* (2), *V. damsela* (2), *V. costicola* (2), *V. splendidus* (1), *V. furnissi* (1), *V. carchariae* (1), *V. anguillarum* (1) e *V. fisheri* (1). Para a realização dos testes de susceptibilidade a concentração de cada estirpe foi previamente ajustada a $1,5 \times 10^8$ células por mililitro. O ajuste de concentração foi realizado a partir da suspensão de cada estirpe em solução salina a 0,85% até ajuste da turvação à escala McFarland 0,5. As suspensões ajustadas foram avaliadas quanto à sensibilidade aos antibióticos pela metodologia de difusão em agar¹⁰. Foram utilizados discos (Cecon) contendo Ácido Nalidíxico (NA) 30µg, Tetraciclina (TET) 30µg, Cloranfenicol (CLO) 30µg, Imipenem (IPM) 10µg, Cefoxetina (CFO) 30µg, Gentamicina (GEN) 10µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, Nitrofurantoína (NIT) 300µg, Ceftriaxona (CRO) 30µg, Ampicilina (AMP) 30µg e Sulfazotrim (SUT) 25µg. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição em milímetro.

As espécies que apresentaram resistência aos antimicrobianos foram: *V. cholerae*, onde 33,33% mostram-se resistentes a SUT, 25% com resistência a AMP e 33,33% a CRO. Das cepas de *V. fluvialis*, 16,7% apresentaram resistência a SUT e 33,33% a AMP. Das cepas de *Vibrio* spp, 16,7% revelaram resistência a SUT, 16,7% a CRO. Das estirpes de *V. harveyi*, 20% apresentaram resistência a SUT. A resistência a AMP foi observada em *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* e *V. costicola* na ordem de 50, 75, 50 e 50%, respectivamente. Uma cepa de *V. splendidus* apresentou-se resistente ao NA.

A presença de estirpes de *Vibrio* resistentes a antibióticos na aquicultura vem sendo relatada. Moriarty¹¹, nas Filipinas em 1996 estudou amostras de *Vibrio* isoladas de camarão e verificou que todas as amostras apresentaram resistência aos antibióticos, incluindo cloranfenicol, furazolidonas, oxitetraciclinas e estreptomicinas. Alvarez et al.¹² revelaram dados semelhantes aos obtidos

no presente estudo. Os autores observaram elevada sensibilidade das estirpes de *Vibrio* a ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina e gentamicina. No presente estudo os vibrios isolados mostram-se sensíveis a GEN e CLO. Os autores detectaram resistência ao ácido nalidíxico, estreptomocina, canamicina, novobiocina, penicilina, polimixina B, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol e a derivados de sulfa. Neste estudo observou-se resistência ao NA em uma estirpe de *V. splendidus* e não foi encontrada resistência à TET. Entretanto, 20% das estirpes de *V. harveyi* desenvolveram comportamento intermediário frente ao NA.

Os isolados de *Vibrio* spp das amostras de água e camarão mostraram-se resistentes a SUT e CRO, com comportamento intermediário frente à AMP. Esses dados não podem ser comparados aos obtidos por Saavedra et al.¹³, uma vez que os autores revelaram que 40% das estirpes de *Vibrio* spp isoladas de robalo apresentaram resistência a AMP.

A sensibilidade das cepas de *V. cholerae* ao CLO observada no presente estudo é comparável aos resultados obtidos por Sathiyamurthy, Purushothaman e Ramaiyan¹⁴. Os autores estudaram a resistência a antibióticos de 770 estirpes de *V. cholerae* não O1 isoladas de amostras de água estuárias, sedimento, plâncton e alimentos de origem marinha no sudeste da Índia. Observaram sensibilidade de todas as estirpes a cefalotin (30 mcg), clorafenicol (30 mcg), e polimixina-B (300 mcg). Entretanto, as cepas isoladas do ambiente e dos alimentos mostraram-se resistentes a oxitetraciclina, estreptomocina, sulfadiazina e tetraciclina.

Molitoris et al.¹⁵ estudaram 199 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de água e de alimentos de origem marinha da Baía de Jakarta, na Indonésia. Detectaram maior porcentagem de resistência quando comparado aos dados obtidos na presente pesquisa, mostrando resistência a ampicilina (67,3%), gentamicina (2%), tetraciclina (5,7%) e ácido nalidíxico (3%).

Observou-se também neste estudo a resistência múltipla em 5 cepas de *V. cholerae*

não tipado, com 2 (16,6%) cepas resistentes a AMP e CRO, 2 (16,6%) resistentes a SUT e CRO, e 1 (8,3%) com multirresistência a AMP, CRO e SUT. Um isolado de *Vibrio* spp apresentou resistência múltipla a SUT e CRO.

Para Campos¹⁶, o monitoramento da resistência antimicrobiana em *V. cholerae* faz-se necessária em função da ocorrência de amostras multirresistentes, contendo plasmídios R e integrons codificando vários genes de resistência. Vieira et al.¹⁷ detectaram resistência múltipla a antibióticos em estirpes de *V. alginolyticus* e *Vibrio* spp isoladas de larvicultura de camarão marinho. A estirpe de *V. alginolyticus* apresentou resistência a sulfonamidas e penicilina, e a de *Vibrio* spp mostrou-se resistente a eritromicina, tetraciclina, ciproflaxacina, penicilina e sulfonamidas.

As cepas de *Vibrio* multiresistentes aos antibióticos, observadas no presente estudo, podem ser indicativas do uso desses antimicrobianos como controle e prevenção de enfermidades no cultivo dos peneídeos. A resistência múltipla a antibióticos é alta em ambientes onde há uso dessas drogas.^{5,18} Apesar de ter sido detectada múltipla resistência no presente estudo, não se pode afirmar que esse fenômeno é decorrente do uso indiscriminado de antibióticos na fazenda pesquisada. Nesse sentido, Lima et al.⁵ em pesquisa sobre a resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação de tilápias (*Oreochromis niloticus*), relataram a presença de bactérias resistentes a todos os antimicrobianos testados tanto no ambiente de criação como nos filés de tilápias, apesar de não haver uso dessas drogas na piscicultura estudada. Segundo os autores, estes resultados sugerem que a resistência a antimicrobianos pode ser promovida e mantida por outros fatores que o uso de antimicrobianos no meio aquícola.

A resistência a antibióticos em microrganismos pode ser produzida por características inerentes às células, sendo geralmente determinada por genes cromossômicos. Por outro lado, algumas estirpes podem sofrer mutações, receber

plasmídeos ou transposons e, desse modo, adquirir uma resistência que caracterizará a linhagens deles originadas.¹⁹

De acordo com Sotomayor e Balcázar²⁰, a tendência atual é restringir ou reduzir o uso de antibióticos devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana, problemas ecológicos, restrições a importações pela presença de resíduos nos tecidos de camarão e possíveis danos à saúde pública. Em resposta a esse problema, o uso de cepas probióticas na aquicultura vem sendo estudado. Gullian e Rodríguez²¹ em estudo sobre as qualidades imunostimulantes de novas bactérias probióticas associadas ao cultivo do *L. vannamei*, demonstraram que algumas bactérias benéficas da microflora do hepatopâncreas são competidoras em potencial de cepas patogênicas. Os resultados indicaram diminuição da instalação do patógeno no hepatopâncreas, indicando que

a natureza probiótica baseia-se na diminuição da instalação do patógeno dentro do hospedeiro, diminuindo dessa forma o risco de enfermidade. Vieira et al.¹⁷ afirmam, por outro lado, que o uso de probióticos é útil na prevenção de vibrioses, com potencial substituir os antibióticos, de não poluir o ambiente, não selecionar cepas resistentes e melhorar o crescimento de pós-larvas.

A presença de cepas de *Vibrio* em amostras de água e de camarão resistentes a ampicilina, sulfazotrim e ceftriaxona sugere que tanto os camarões, como a área de cultivo estudada, podem constituir fonte de bactérias resistentes. Por outro lado, como não foram feitos estudos de caracterização da resistência cromossômica ou plasmidial, não se pode afirmar que a resistência observada nas bactérias do presente estudo seja transferida para a microbiota autóctone filogeneticamente distinta.

In vitro antimicrobial susceptibility of *Vibrio* spp isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and water from ponds of a shrimp farm in Ceará

Abstract

Susceptibility assays were performed for 48 *Vibrio* strains isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* in Ceará, Brazil. The diffusion assays tested 11 antibiotics. The most resistant species was *V. cholerae*: of 12 strains tested, one third was resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim, one fourth to ampicillin and one third to ceftriaxone.

Key words:

Antibiotics.

Vibrio.

Litopenaeus vannamei.

Referências

- 1 AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VAZQUEZ-JUAREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of american white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 215-219, 2001.
- 2 GÁMEZ, C. I.; GALAVÍZ, J. R. G.; SILVA, L. G.; GARZA, Z. J. M.; VELARDE, M. S. T. Detección y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición**, n. 6, 2004. Edición especial. Disponível em: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2004/resumenes_juany/70.htm>. Acesso em: 21 nov. 2006.
- 3 ABRAHAM, T. J. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3-4, p. 28-31, 2004.
- 4 MORIARTY, D. J. W. **Os perigos do uso de**

antibióticos na aquicultura. Orientações técnicas – Aqualider. 2003. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br/article.php>>. Acesso em: 8 fev. 2006.

5 LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICOLLI, R. H.; BUENO-FILHO, J. S. S.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 126-132, 2006.

6 HOWGATE, P. Review of public health safety of products from aquaculture. **International Journal Food Science and Technology**, v. 33, p. 99-125, 1998.

7 CHYTHANYA, R.; NAYAK, D. K.; VENUGOPAL, M. N. Antibiotic resistance in aquaculture. **Infofish International**, v. 6, p. 30-32, 1999.

8 HOFER, E.; QUINTAES, B. R.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; SEKI, L. M.; FEITOSA, I. S.; RIBEIRO, L. H. F.; FERREIRA, M. R. Emergência da

- múltipla resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* isolados de pacientes com gastroenterite no Ceará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 151-156, 1999.
- 9 DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington DC: APHA, 2001. 600 p.
- 10 NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A8**. 8th ed. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
- 11 MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. Microbial Biosystems: New Frontiers. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 8., 1999, Canadá. **Proceedings...** Disponível em: <http://ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty.PDF>. Acesso em: 22 nov. 2006.
- 12 ALVAREZ, J. D.; AGURTO, C.; PERAZA, L.; PARRA, R. Estudios microbiológicos y serológicos em acuicultura. **Jornadas Técnicas del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Venezuela**, 2001. Disponível em: <<http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/congresos/jornadas/web/jalvarez2.htm>>. Acesso em: 8 fev. 2006.
- 13 SAAVEDRA, M. J.; BRITO, R. D.; SOUSA, M.; ALVES, A.; REMA, P. Isolation of *Pasteurella* spp and *Vibrio* spp in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): susceptibility to different antibiotic groups. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 277-279, 2004.
- 14 SATHIYAMURTHY, K.; PURUSHOTHAMAN, A.; RAMAIYAN, V. Antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* in Parangipettai coastal environs, South East India. **Microbial Drug Resistance**, v. 3, n. 3, p. 267-270, 1997.
- 15 MOLITORIS, E.; JOSEPH, S. W.; KRICHEVSKY, M. I.; SINDHUHARDJA, W.; COLWELL, R. R. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1388-1394, 1985.
- 16 CAMPOS, L. C. *Vibrio cholerae*. In: TRABALSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 337-343.
- 17 VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C.; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M.; CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 33, p. 107-112, 2000.
- 18 VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal Food Microbiology**, v. 76, p. 165-168, 2002.
- 19 BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Agentes Antimicrobianos. In: BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 157-173.
- 20 SOTOMAYOR, M. A.; BALCÁZAR, J. L. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. **Revista Aquatic**, n. 19, p. 9-15, 2003.
- 21 GULLIAN, M.; RODRIGUÉZ, J. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades em camarones. In: CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA. 6., 2002. Equador. **Anais...** p. 47-49.