



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Caracterização da microbiota bacteriana de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)(Mollusca: Gastropoda)

TATIANA MARIA DA SILVA

RECIFE/PE

2012

TATIANA MARIA DA SILVA

Caracterização da microbiota bacteriana de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)(Mollusca: Gastropoda)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador : Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

MD, PhD

Co-orientador : Prof. Dr Luiz Carlos Alves

MD, PhD

RECIFE/PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

S586c Silva, Tatiana Maria da.
Caracterização da microbiota bacteriana *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) / Tatiana Maria da Silva. – Recife: O autor, 2012.
69 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. Anti-infecciosos. 3. Microbiota. 4. Bactérias. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

616.014 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-088)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

PROFESSORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

6

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

TATIANA MARIA DA SILVA

No dia 29 de fevereiro de 2012, às 09h00, Sala 01 do 3º andar do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE, os Membros Doutores: **a Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa – Presidente da Banca (UFPE), o Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (UFMG) e o Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **TATIANA MARIA DA SILVA** sobre a sua Dissertação intitulada “**Caracterização da microbiota bacteriana de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda)**”, a qual foi **orientada pelo Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ-PE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa

APROVADA

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

APROVADA

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

APROVADA

Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Sílvio Romero de Barros Marques

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DEDICATÓRIA

A meus queridos pais, pela enorme dedicação e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me algo tão fantástico e precioso, a vida!

A meus pais, por todo o amor e sacrifício, o que deu frutos, pois estou aqui agora!
Amo vocês!

Ao meu querido irmão, Klayton, por todo o carinho e amor oferecidos a mim em diversos momentos desta jornada;

A meu querido noivo, amor da minha vida, por estar sempre ao meu lado, compartilhando momentos felizes e tristes, sendo muito paciente e compreensivo comigo;

Aos meus queridos orientadores: Fábio Brayner e Luiz Carlos, pela acolhedora recepção no laboratório e pela paciência e sensibilidade ao aceitar o meu estilo de vida muito atribulado;

A professora Dra. Ana Catarina, pela constante ajuda e atenção dedicadas a mim durante a elaboração deste trabalho (muito obrigada);

À banca examinadora, por ter aceito o convite e pela contribuição oferecida a este trabalho;

À Professora Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, pela doçura e simpatia para comigo desde o primeiro dia de aula;

A Camila Duarte, pela fundamental contribuição dada a este trabalho;

Aos meus colegas do laboratório: Thyago, Gladiston, Dyana, Adriana, Catarina, Grazi, Gabriel, Leandro e Fernanda pelos momentos de descontração e companheirismo;

À Elverson, pela grande ajuda no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, saindo tarde do Aggeu diversas vezes para realizar os experimentos junto comigo;

A Marília Gabriela pela importante ajuda prestada na construção desta dissertação;

À Ana Paula pela extrema doçura e grande contribuição prestada na construção desta dissertação;

À Roberto, pela obtenção dos caramujos. Muito obrigada pela ajuda!

Aos queridos colegas de turma: Wheverton e Fabiana Letícia, parceiros desde o primeiro dia de aula, que me acompanharam durante toda a jornada do mestrado e com quem compartilhei muitas emoções (adoro vocês e vou sentir saudades);

Aos demais colegas de turma: Thyago, Marcelle, Armando, Gabriela, Emilly, Carlos Weber, Bruno Sampaio, Zoraya e Bruno Galvão, por todos os momentos de descontração;

Aos funcionários da esterilização do Aggeu, e em especial a Edson, por me ajudar tantas vezes. É sempre bom saber que existem pessoas prestativas neste mundo!

Aos funcionários da esterilização do LIKA pelo grande apoio;

Aos funcionários da malacologia pela disponibilidade em me ajudar nas vezes em que precisei;

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, e em especial a Rafael, por todo o empenho em me ajudar (Obrigada);

À Maria José Lira, pela imensa ajuda e compreensão ao me liberar algumas vezes, no trabalho, para assistir às aulas (muito obrigada, querida);

Às minhas queridas amigas de vida: Cris, Taci e Nayara, por estarem sempre ao meu lado, principalmente, quando mais precisei, compartilhando muitas emoções (amo vocês);

A meus amigos: Rosângela, Sandra, Paulinho, Glícia, Karla, Juliana, Cynthia e Wellington pelo imenso carinho sempre dedicados a mim;

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

“Se o que eu sou é também o que eu escolhi ser, aceito a condição”

Rodrigo Amarante

RESUMO

Devido a grande importância da microbiota no desenvolvimento de parasitas nos invertebrados, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para o melhor entendimento desta interação. Desta forma, a associação entre microrganismos e seus hospedeiros invertebrados, vetores de doenças, está se tornando cada vez mais evidente. Com base nisto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a microbiota bacteriana de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Para isto, um grupo de caramujos selvagens, provenientes da Vila Sotave em Jaboatão dos Guararapes, PE/Brasil, e um grupo não selvagem, mantido em laboratório, tiveram a sua microbiota caracterizada através da: técnica de coloração de Gram, análise morfológica das colônias em ágar sangue e em ágar Eosina Azul de Metileno, sendo a caracterização confirmada pelo sistema de identificação bacteriana VITEK 2. Foram realizados testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, com base no método de difusão em disco. Os antimicrobianos empregados pertencem à classe de β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, inibidores da via folato, fenicóis e tetraciclinas. Os resultados mostraram que todas as bactérias foram gram negativas, incluindo 11 gêneros bacterianos, sendo *Enterobacter cloacae* a espécie predominante em caramujos selvagens, enquanto que, *Citrobacter freundii* e *Aeromonas sobria* predominaram no grupo não selvagem. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados mostraram-se resistentes ao β -lactâmico amoxicilina e sensíveis ao meropenem. A partir destes resultados, novas estratégias de controle biológico da esquistossomose podem ser propostas.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*, microbiota, antimicrobianos.

ABSTRACT

Due to the great importance of the microbiota in the development of parasites in invertebrates, many studies have been conducted to better understand this interaction. Therefore, the association between microorganisms and their invertebrate hosts, vectors of disease, is becoming increasingly evident. Based on this, the aim of this study was to characterize the bacterial microflora of snails *Biomphalaria glabrata*, the main intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Thus, a group of wild snails, from Vila Sotave in Jaboatão Guararapes, PE / Brazil, and a not wild group (maintained in the laboratory), had their microbiota characterized by: Gram staining, morphological analysis of colonies on blood agar and eosin methylene blue agar, and confirmed by the characterization of bacterial identification system VITEK 2. Tests of antimicrobial susceptibility, based on disk diffusion method. The antimicrobial agents used belong to the class of β -lactams, aminoglycosides, quinolones, folate pathway inhibitors, fenicolis and tetracyclines. The results showed that all bacteria were Gram-negative including 11 bacterial genera, and the *Enterobacter cloacae* was the predominant species in the wild group, while *Citrobacter freundii* and *Aeromonas sobria* predominated in the not wild group. Regarding the antimicrobial susceptibility, all isolates were resistant to β -lactam amoxicillin and susceptible to meropenem. From these results, new strategies for biological control of schistosomiasis can be proposed.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*, microbiota, antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i>	20
Figura 2 <i>Biomphalaria glabrata</i>	21

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

	Pág.
Tabela 1 Percentual dos isolados bacterianos presentes em cada exemplar de <i>B. glabrata</i> , nos grupos selvagens e não selvagens após a avaliação de trinta caramujos.....	43
Tabela 2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos identificados.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH - Belo Horizonte

BHI - Brain Infusion Heart

BHA - Brain Ágar Heart

EMB – Eosin Methylene Blue

CLSI - Clinical and Laboratories Standards Institute

OMS - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. APRESENTAÇÃO	17
2. REVISAO DA LITERATURA.....	19
2. 1. Esquistossomose.....	19
2. 1. 1. Moluscos transmissores da esquistossomose mansonii (gênero <i>Biomphalaria</i>).....	20
2. 1. 2. <i>Biomphalaria glabrata</i>	21
2. 2. Microbiota.....	23
2. 2. 1. Importância da microbiota.....	23
2. 3. Controle biológico.....	24
2. 4. Antimicrobianos.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3. 1. Geral.....	27
3. 2. Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4. 1. Desenho do estudo.....	29
4. 2. Local do estudo.....	29
4. 3. População de estudo.....	29
4. 4. Categorização das variáveis.....	30
4. 5. Operacionalização da pesquisa.....	30
4. 5. 1. Manutenção dos caramujos.....	30
4. 5. 2. Manipulação dos caramujos.....	31
4. 5. 3. Avaliação microbiológica.....	31
4. 5. 4. Análise morfológica das colônias.....	31
4. 5. 5. Análise pela coloração de Gram.....	32
4. 5. 6. Obtenção de culturas puras.....	32
4. 5. 7. Identificação bacteriana.....	32
4. 5. 8. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	32
4. 5. 9. Considerações éticas.....	33

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1.	ARTIGO.....	37
	Caracterização da microbiota bacteriana de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda), provenientes do Brasil.....	37
6.	CONCLUSÃO.....	51
7.	RECOMENDAÇÕES E/OU CONSIDERAÇÕES DA DISSERTAÇÃO.....	53
8.	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXOS	60
	Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE	61
	Anexo B – Normas da Revista	62

APRESENTAÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

A associação entre os animais e sua microbiota vem sendo alvo de intensas pesquisas. Porém, enquanto as interações entre microrganismos e animais vertebrados vêm sendo bem estudadas, pouca atenção tem sido dada à interação entre invertebrados e sua microbiota. Em muitos invertebrados, microrganismos, em associação simbiótica, desempenham funções essenciais para o bom funcionamento de processos fisiológicos (MOUCHKA et al. 2011).

A grande maioria dos estudos que associam invertebrados e sua microbiota, está relacionada ao filo Artropoda: *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* e *Psorophora columbiae* (DEMAIO et al. 1996), *Lutzomyia longipalpis* (GOUVEIA, et al. 2008); (OLIVEIRA et al. 2000; 2001); *Xenopsylla cheopis*, *Oropsylla montana* e *Ctenocephalides felis felis* (ERICKSON et al. 2009).

Na literatura, existem poucos estudos envolvendo a microbiota de moluscos, como *Helix pomatia* (CHARRIER et al. 2006; VILLENA et al. 2010), *Helix aspersa* (CHARRIER et al. 1998; *Cornu aspersum* (CHARRIER et al. 2006), *Hirudo medicinalis* (GRAF 1998) e *Biomphalaria glabrata* (DUCKLOW et al. 1979).

Alguns trabalhos destacam a importância da microbiota na manutenção do ciclo evolutivo de patógenos nos invertebrados, como XI et al. (2008), que observaram a inibição do desenvolvimento do vírus da dengue pela flora bacteriana intestinal do mosquito *Aedes aegypti* e DONG et al. (2009), que observaram um maior desenvolvimento do protozoário *Plasmodium falciparum* após a remoção da microbiota intestinal do mosquito *Anopheles gambiae*.

Dessa forma, o conhecimento da microbiota desses invertebrados pode ser de extrema importância para que medidas de controle biológico possam ser tomadas. Uma alternativa para o controle da transmissão de infecções, é o uso da tecnologia envolvendo alteração genética de bactérias, as quais irão expressar proteínas com propriedades anti-parasitárias (DURVASULA et al. 1997; YOSHIDA et al. 2001; RIEHLE et al. 2007; DJADID et al. 2011).

Diante disto, o presente estudo, procurou caracterizar a microbiota de caramujos da espécie *B. glabrata*, oriundas de Pernambuco/Brasil para que, de posse destas informações, novas estratégias de controle da esquistossomose possam ser propostas.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. Esquistossomose

A esquistossomose mansônica é uma helmintíase causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* e vem atingindo pessoas no mundo inteiro. A OMS estima que cerca de 200 milhões de pessoas, vivendo em regiões tropicais e subtropicais, estejam infectadas com o parasita e que, das 120 milhões apresentando sintomatologia, 20 milhões desenvolvem doenças crônicas (BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008), representando um enorme problema de saúde pública em escala mundial, devido à gravidade que a doença assume em muitos casos e ao déficit orgânico que produz, constituindo um sério problema para as populações das áreas endêmicas (REY, 2010). A esquistossomose é uma doença de veiculação hídrica, e sua patologia é caracterizada por uma fase aguda, muitas vezes assintomática, e outra crônica, na qual podem aparecer as formas graves, evidenciadas principalmente pela hipertensão porta ou pulmonar (VERONESI, 2005).

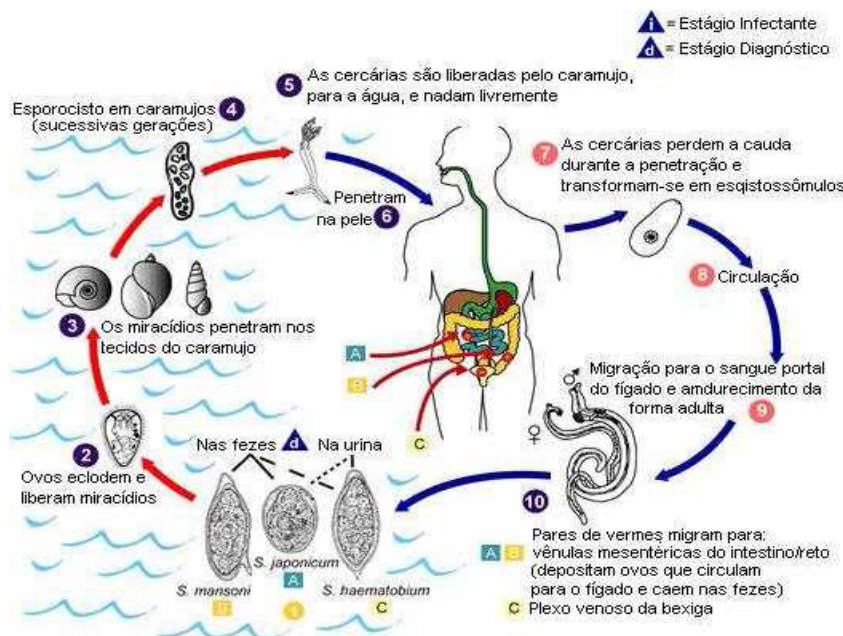
O termo esquistossoma deriva da aparência do macho adulto, cujo corpo apresenta um sulco ou canal genital longitudinal que serve como receptáculo para a fêmea durante a copulação (KONEMAN; WINN, 2006). Atualmente, existem seis espécies de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. hematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*) que podem provocar doença no homem, sendo que no continente americano existe apenas o *S. mansoni* (MS, 2008).

O *S. mansoni* é um platelminto dióico da família *Schistosomatidae* e é caracterizado pela presença de duas ventosas e aspectos peculiares do tubo digestivo. A sua implantação no Brasil iniciou-se pelo Nordeste, onde encontrou excelentes condições ecológicas, como precárias condições sanitárias e a presença do caramujo hospedeiro (GASPARINI, 2004).

A esquistossomose apresenta um ciclo heteroxênico, ou seja, o parasita se desenvolve em dois hospedeiros: sendo um intermediário e um definitivo. O hospedeiro intermediário corresponde ao caramujo do gênero *Biomphalaria* e o hospedeiro definitivo corresponde a um mamífero sendo geralmente representado pelo homem (VERONESI, 2005). O ciclo biológico do *S. mansoni* está descrito na Figura 1.

Figura 1. Ciclo biológico do *S. mansoni*.

Fonte: Adaptação de Centro de Vigilância epidemiológica (CVE, 2005).



2.1.1. Moluscos transmissores da esquistossomose mansoni (gênero *Biomphalaria*)

No Brasil, há três espécies importantes, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, responsáveis pela transmissão da esquistossomose mansoni, doença que atinge o sistema porta-hepático e circulatório humano (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2006), tendo o *B. glabrata* como o principal hospedeiro intermediário e que ocorre em quase todo território nacional.

O hábitat de preferência de *Biomphalaria* para colonização é de microflora rica, bastante matéria orgânica, boa insolação, temperatura da água entre 20° C e 26° C, pH neutro tendendo a alcalino, salinidade abaixo de 3‰ (3 g de sais por quilograma de água), pouca turbidez e velocidade da água inferior a 30cm/s, com leito raso, lodoso ou rochoso e vegetação enraizada mais próxima das margens (NEVES, 2005 FERNANDO SCHEMELZER DE MORAES BEZERRA).

Os caramujos hospedeiros do *S. mansoni* são hermafroditas, podendo haver reprodução cruzada entre eles. A postura dos ovos geralmente ocorre à noite, e estes ficam contidos em massas gelatinosas e transparentes que se aderem às

folhas de plantas aquáticas ou outras superfícies. No laboratório, é comum eles ficarem aderidos à parede dos aquários (IGLÉSIAS, 1997).

2. 1. 2. *Biomphalaria glabrata*

Esta importante espécie de caramujo, transmissora da esquistossomose, pode ser encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe. Ocorre em quase todo território nacional e é considerada a espécie mais susceptível por se infectar com todas as linhagens de *S. mansoni*, como BH e SJ (MAGALHÃES e DIAS, 1973) encontradas no Brasil (MS, 2008). GUIMARÃES et al. (1997), observaram elevada taxa de infecção desta espécie (90%) com a linhagem LE, de Belo Horizonte.

É o maior molusco da família *Planorbidae*, cuja concha pode atingir 40 mm de diâmetro, 11mm de largura com seis a sete giros (Figura 2), embora esse diâmetro possa variar, pois o tamanho do molusco está relacionado à densidade populacional e às condições das águas (NEVES, 2005).

Figura 2. *Biomphalaria glabrata*.

Fonte: <http://www-ibmc.u-strasbg.fr>



Com relação à taxa de infecção, o número de cercárias produzidas varia com a espécie do caramujo, sendo muito elevada em *B. glabrata*. Esta espécie apresenta um percentual muito alto, podendo eliminar 1.000 a 3.000 cercárias por dia e mais de 100.000 cercárias por toda a vida do molusco (REY, 2010). Apesar disso,

SANTOS e RODRIGUES (2006), demonstraram *in vitro*, a ação letal da hemolinfa de *B. glabrata* sobre os miracídios de *S. mansoni*, de origem fecal e hepática de camundongos infectados por este parasita, mostrando assim que a hemolinfa deste hospedeiro representa um grande fator de defesa contra a invasão do parasita *S. mansoni*.

Segundo COIMBRA Jr. (1981), em trabalho realizado com caramujos das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, no Distrito Federal, a taxa de infecção, demonstrada experimentalmente, em *B. glabrata* foi expressiva (54,4%), enquanto que *B. tenagophila* se mostrou refratária à infecção pelo *S. mansoni*. Por conta disso, essa espécie torna-se importante no ciclo de transmissão da esquistossomose em diversas regiões. É consenso entre os autores que a presença desta espécie em uma localidade está associada, quase sempre, a um aumento considerável da prevalência da esquistossomose mansônica (TELES, 1986).

Em Pernambuco, a ocorrência de *B. glabrata* vem se expandindo para diversos locais onde antes não era observada. Por exemplo, BARBOSA et al. (2001), notificaram uma epidemia de esquistossomose na praia de Porto de Galinhas analisando as localidades de Merepe III, Salinas, Pantanal, Socó e Vila de Porto as quais representam cerca de 70% da área habitada de Porto de Galinhas. Neste estudo, Merepe III constituiu a localidade que apresentou o maior número de casos agudos. As infecções ocorreram após uma enchente no ano de 2000. Acredita-se que os caramujos chegaram até o local com a areia de aterros de manguezais e que foram infectados com material proveniente do extravasamento de fossas.

Com relação à caracterização da microbiota de *B. glabrata*, apenas um trabalho foi desenvolvido. Este estudo foi realizado em três locais: Porto Rico, Guadalupe e Santa Lúcia por DUCKLOW et al. 1979, onde esses autores encontraram diversos gêneros bacterianos fazendo parte da microbiota destes moluscos, como por exemplo: *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Acinetobacter* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Pasteurella* sp.

2. 2. Microbiota

Existe, na natureza, um grande inter-relacionamento entre os seres vivos, que varia desde a colaboração mútua (simbiose) até o predatismo e canibalismo (NEVES, 2005). Simbiontes são dois ou mais organismos de espécies diferentes cujo relacionamento pode ser benéfico para um, ou para todos os simbiontes ou ser inofensivo para um simbiote. O dinâmico equilíbrio simbiótico pode deslocar-se na direção do estado mórbido parasítico/patogênico se as defesas do hospedeiro estão comprometidas com um simultâneo aumento da suscetibilidade do hospedeiro ao estabelecimento da infecção (BURTON; ENGELKIRK, 1998). A relação de simbiose pode ser evidenciada através da existência, nos seres vivos, da chamada microbiota ou flora normal.

O termo microbiota refere-se à população de microrganismos que habita a pele e mucosas de indivíduos normais e sadios e que desempenha um papel bem-definido na manutenção da saúde, impedindo a colonização por patógenos e o possível estabelecimento de doença (JAWETZ et al. 2009).

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar a microbiota de invertebrados, como os artrópodes: *Lutzomyia longipalpis*, hospedeiro intermediário da leishmaniose visceral (GOUVEIA et al. 2008) e *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* e *Psorophora columbiae* (DEMAIO et al. 1996).

Outros invertebrados, como os moluscos também foram avaliados quanto à caracterização da microbiota, como *Helix pomatia* (CHARRIER et al. 2006; VILLENA et al. 2010), *Cornu aspersum* (CHARRIER et al. 2006), *Hirudo medicinalis* (GRAF 1998) e *B. glabrata* (DUCKLOW et al. 1979).

2. 2. 1. Importância da microbiota em invertebrados

A microbiota exerce um papel fundamental na defesa dos organismos contra infecções. Dessa forma, o papel da microbiota na proteção de organismos frente aos patógenos pode ser evidenciado através de alguns estudos realizados recentemente. Por exemplo, ERICKSON et al. (2009), sugeriram que a microbiota de pulgas transmissoras potenciais de *Yersinia pestis* como *Xenopsylla cheopis* e *Oropsylla montana* e de pulgas transmissoras menos susceptíveis como

Ctenocephalides felis felis, constituída principalmente por *Acinetobacter* sp., esteve envolvida na susceptibilidade ou resistência da transmissão da *Y. pestis*.

Nem todas as bactérias estão envolvidas com a proteção dos invertebrados. DEAN et al. (1970) observaram que *Aeromonas liquefasciens* está implicada na síndrome leucodérmica em caramujos da espécie *Achantina fulica*. E ROMALDE E BARJA (2010), realizando uma revisão sobre as principais doenças provocadas por espécies de *Vibrio*, em bivalves, mostraram que estas bactérias causavam mortalidade durante os diferentes estágios de vida destes moluscos. Esses autores sugerem que a água do mar determina a composição da microbiota destes moluscos. Sendo assim, afirmam que a melhor maneira de evitar a contaminação é através do controle da microbiota ambiental que mantém o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas, impedindo a proliferação de microrganismos oportunistas.

2. 3. Controle biológico

O controle biológico é uma técnica utilizada no combate a espécies que nos são nocivas, reduzindo os prejuízos causados por elas. Comumente, esse método consiste em introduzir no ecossistema um inimigo natural (predador ou parasita) da espécie nociva, para manter a densidade populacional dessa espécie em níveis compatíveis com os recursos do meio ambiente. Quando bem planejado, o controle biológico acarreta evidentes vantagens em relação ao uso de agentes químicos, uma vez que não polui o ambiente e não causa desequilíbrios ecológicos (FOLHA AGROPECUÁRIA, 1985).

Medidas para o controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose vêm sendo tomadas no decorrer dos anos. A busca por soluções alternativas, não poluidoras, para o controle dessa endemia tem sido uma preocupação constante para a Saúde Pública (BARBOSA, 1995). JOBIN et al. (1977), realizaram um estudo, em diversos reservatórios de Porto Rico, onde o molusco *Marisa cornuarietis* foi introduzido nestes locais previamente povoados pelo caramujo *B. glabrata*. Durante 20 anos, esta população foi observada e verificaram que, à medida que diminuía o número de exemplares de *B. glabrata* em determinada coleção hídrica, aumentava a população da espécie *Marisa cornuarietis*. GUIMARÃES et al. (1983), avaliaram o potencial predatório de hirudíneos da

espécie *Helobdella triserialis* sobre exemplares de *B. glabrata* e verificaram que, nas condições do experimento, o *H. triserialis* representa um efetivo predador de *B. glabrata* atuando principalmente sobre os exemplares recém-eclodidos e jovens.

Sendo assim, uma outra alternativa vem sendo proposta, como a paratransgênese. Essa tecnologia consiste na alteração genética de microrganismos para expressarem moléculas com propriedades anti-patogênicas (BEARD et al. 2002). Com base nisto, DJADID et al. (2011), após identificarem a microbiota de *Anopheles stephensi* e *Anopheles maculipennis*, propuseram a aplicação da paratransgênese como ferramenta contra a malária.

2. 4. Antimicrobianos

A era atual da quimioterapia antimicrobiana começou em 1935, com a descoberta das sulfonamidas. Após a descoberta da penicilina em 1929, foi demonstrado, em 1940, a eficácia terapêutica desta substância. Durante os 25 anos seguintes, as pesquisas de agentes quimioterápicos concentraram-se, em grande parte, em substâncias de origem microbiana, denominadas antibióticos (JAWETZ et al. 2009).

CORREIA, 2007) ressalta a importância do controle do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar, lançando duas estratégias para a restrição do uso de antimicrobianos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3. 1. Geral

Caracterizar a microbiota de *B. glabrata* selvagem e não selvagem.

3. 2. Específicos

- Identificar a microbiota bacteriana presente no macerado da parte mole de *B. glabrata* selvagem e não selvagem;
- Comparar a microbiota bacteriana de *B. glabrata* selvagem e não selvagem;
- Avaliar a susceptibilidade dos diferentes isolados bacterianos identificados em *B. glabrata* selvagem e não selvagem, a antimicrobianos de amplo espectro.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1. Desenho do estudo

Estudo descritivo para a caracterização da microbiota de *B. glabrata* selvagem e não selvagem.

4. 2. Local do estudo

Todos os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica (LIKA), Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Dept. Parasitologia, CPqAM) e o Laboratório de Esquistossomose (Dept. Parasitologia, CPqAM), os quais apresentaram estrutura e equipamentos necessários para o cumprimento dos objetivos referentes ao projeto.

4. 3. População do estudo

A população de estudo foi composta por dois grupos de caramujos da espécie *B. glabrata*, sendo analisados apenas caramujos selvagens e com capacidade de locomoção.

Grupo 1- 30 caramujos selvagens com diâmetro de aproximadamente 10 mm, provenientes da Vila Sotave, em Jaboatão dos Guararapes, PE/Brasil;

Grupo 2- 30 caramujos não selvagens, com diâmetro de aproximadamente 10 mm, mantidos no Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ, PE/Brasil.

4. 4. Categorização das variáveis

Variáveis Independentes		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Caramujos selvagens	Os caramujos considerados selvagens são aqueles provenientes do campo.	<i>B. glabrata</i> selvagem ou não selvagem
Caramujos não-selvagem	Os caramujos considerados não-selvagens são aqueles mantidos no laboratório sob condições controladas	<i>B. glabrata</i> selvagem ou não selvagem
Microbiota Bacteriana	São bactérias que habitam naturalmente as partes moles do caramujo	Bactérias Gram positivas e Gram negativas
Variável Dependente		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Perfil de susceptibilidade da bactéria frente aos antimicrobianos	Avaliação do diâmetro do halo de inibição da bactéria ao antimicrobiano administrado	Sensível, intermediário e resistente

4. 5. Operacionalização da pesquisa

4. 5. 1. Manutenção dos caramujos

Os caramujos não-selvagens foram alimentados semanalmente com alface *ad libitum*, e a água desclorada dos aquários foi também trocada semanalmente, ou de acordo com a necessidade. Foram submetidos a um fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro, considerando o período de luz das 6h:00 às 18h:00. Os caramujos selvagens foram retirados diretamente do campo e processados no dia seguinte.

4. 5. 2. Manipulação dos caramujos

Apenas caramujos intactos com capacidade de locomoção foram analisados. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de forma asséptica de acordo com a metodologia de DUCKLOW et al. (1979), com modificações. Resumidamente, os moluscos foram previamente colocados em contato com a solução anestésica: Hypnol (Pentobarbital sódico) a 0,04% durante 6 horas. Passado esse tempo, cada molusco teve a sua concha limpa com algodão embebido em álcool a 70% e foi, posteriormente colocado em placa de Petri estéril, sendo suavemente prensado entre duas lâminas de vidro, para quebra da sua concha. Essas lâminas foram previamente mergulhadas em álcool a 70%, sendo depois enxutas com papel toalha e passadas rapidamente sobre a chama do bico de bunsen. Os fragmentos das conchas foram removidos com o auxílio de pinças estéreis e a parte mole do caramujo, transferido para um cadinho estéril contendo 10 ml de caldo BHI, onde foi realizada a homogeneização dessa região com o auxílio de um pistilo estéril, obtendo-se o macerado da parte mole do *B. glabrata*.

4. 5. 3. Avaliação Microbiológica

A avaliação microbiológica do macerado da parte mole de *B. glabrata* foi realizada através do semeio desse material, nos meios apropriados (ágar sangue e ágar Eosina Azul de Metileno), utilizados para a identificação de bactérias gram-positivas e gram-negativas e apenas de gram-negativas, respectivamente. Após o semeio, as placas foram levadas à estufa bacteriológica e incubadas a uma temperatura de 37° C durante 24 horas. Após esse período, foram observadas as características fenotípicas das colônias. Os caramujos foram analisados individualmente.

4. 5. 4. Análise morfológica das colônias

A análise morfológica das colônias foi realizada através da observação de características fenotípicas exibidas nos meios de cultura descritos anteriormente. O critério de inclusão estabelecido para ser considerada como parte da microbiota foi o

aparecimento de quatro a cinco colônias, apresentando as mesmas características, nos meios de cultura empregados no estudo.

4. 5. 5. Análise pela coloração de Gram

Foi realizada a coloração de Gram, para a identificação presuntiva das bactérias encontradas, segundo técnica descrita em Koneman e Winn (2006).

4. 5. 6. Obtenção de culturas puras

Para a obtenção de culturas puras, cada colônia específica foi depositada em caldo BHI estéril e incubada durante 24 horas a uma temperatura de 37° C. Depois realizou-se o semeio dessas suspensões em ágar Brain Heart Ágar (BHA). Essas placas foram levadas à estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas.

4. 5. 7. Identificação bacteriana

A partir de culturas puras em ágar BHA, obteve-se a identificação bioquímica dos isolados bacterianos através do sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux).

O sistema VITEK 2 (bioMérieux) é um sistema modular integrado que consiste numa unidade de enchimento seladora, um leitor-incubador, um módulo de controle computadorizado, um terminal de dados e uma impressora de múltiplas cópias. Esse sistema detecta o crescimento bacteriano e a ocorrência de reações metabólicas nas microcavidades de finos cartões de plástico utilizando uma tecnologia baseada na fluorescência (KONEMAN e WINN, 2006).

4. 5. 8. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados através do método de difusão em disco, de acordo com as normas do CLSI (2011), em todos os isolados identificados pelos métodos anteriormente descritos.

Os discos de antimicrobianos empregados pertenceram à classe dos β -lactâmicos: cefepime, ceftazidima, amoxicilina, ampicilina, cefalotina, ceftoxitina,

cefotaxima, piperaciclina/tazobactam e meropenem; dos aminoglicosídeos: gentamicina e amicacina; das quinolonas: ciprofloxacina; dos inibidores da via folato: sulfametoxazol/trimetoprim; dos fenicóis: cloranfenicol; e das tetraciclina: tetraciclina.

4. 5. 9. Considerações éticas

Este projeto teve como objetivo principal caracterizar a microbiota de *B. glabrata* selvagem e não selvagem. Portanto, não foram utilizados animais vertebrados convencionais nem material biológico oriundo de seres humanos.

Apesar de não trabalharmos com material biológico de seres humanos, o presente projeto faz parte de um projeto maior e o mesmo já possui parecer favorável à execução pela Comissão de Ética em Pesquisas do Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE (PROTOCOLO: 011.2008) (Anexo A).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão do presente trabalho encontram-se no formato de artigo.

ARTIGO



ARTIGO

Revista: Journal of Applied Microbiology

Caracterização da microbiota bacteriana de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (*Mollusca: Gastropoda*), provenientes do Brasil

^{1, 2} SILVA, T. M.; ^{1,2,4} MELO, E. S.; ³ LOPES, A. C. S.; ^{1, 2} VERAS, D. L.; ⁵ DUARTE, C. R.; ^{1,2,4} ALVES, L. C.; ^{1, 3,} BRAYNER, F. A.

¹ Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil, ² Laboratório de Imunopatologia Prof. Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil, ³ Departamento de Medicina Tropical, Universidade de Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil, ⁴ Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brazil ⁵ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Fábio André Brayner

Corresponding author at: Department of Parasitology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2101 2643; fax: +55 81 2101 2516.
E-mail address: brayner@cpqam.fiocruz.br (F.A. Brayner).

Resumo

Objetivos: Caracterizar a microbiota de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* selvagem, provenientes de Pernambuco, Brasil, e de caramujos não selvagens, mantido em laboratório.

Métodos e resultados: A microbiota destes moluscos foi identificada pelo sistema automatizado VITEK 2. Foram realizados testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizando o método de difusão em disco com antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, inibidores da via folato, fenicóis e tetraciclinas. Os resultados mostraram que todas as bactérias identificadas foram gram negativas, incluindo 11 gêneros bacterianos: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Vibrio* e *Sphingomonas*. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados exibiram resistência a amoxicilina e sensibilidade ao meropenem.

Conclusões: A microbiota de caramujos selvagens exibiu predominantemente *Enterobacter cloacae*, enquanto, os não selvagens, predominantemente, *Citrobacter freundii* e *Aeromonas sobria*.

Significância e impacto do estudo: A partir destes resultados, novas estratégias de controle biológico da esquistossomose, como a paratransgênese, podem ser propostas. Esse é o primeiro estudo sobre a microbiota de *Biomphalaria glabrata* provenientes do Brasil.

INTRODUÇÃO

A estreita associação entre os animais e sua microbiota moldou os caminhos evolutivos de ambos. Enquanto as interações entre microrganismos e animais vertebrados foram bem estudadas, relativamente pouca atenção tem sido dada à interação de invertebrados e sua microbiota. Em muitos invertebrados, microrganismos, em associação simbiótica, exercem atividades essenciais para o bom funcionamento de processos fisiológicos (Morgan et al. 2011).

A grande maioria dos estudos, que associam invertebrados e sua microbiota está relacionada ao filo Artropoda: *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, *Psorophora columbiae* (Demaio et al. 1996), *Lutzomyia longipalpis* (Gouveia et al. 2008) e *Anopheles gambiae* (Dong et al 2009).

Na literatura, existem poucos estudos da microbiota de moluscos, como *Helix pomatia* (Svec et al. 2002; Charrier et al. 2006; Villena et al. 2010), *Cornu aspersum* (Charrier et al. 2006), *Hirudo medicinalis* (Graf 1998) e *Biomphalaria glabrata* (Ducklow et al. 1979) e no Brasil não existem estudos referentes à caracterização da microbiota de *B. glabrata*, principal transmissor da esquistossomose.

A importância da microbiota na manutenção do ciclo evolutivo de patógenos nos invertebrados é evidenciada em alguns estudos: *Aedes aegypti* (Xi et al. 2008), *Anopheles gambiae* (Dong et al. 2009), e *Xenopsylla cheopis*, *Oropsylla montana* e *Ctenocephalides felis felis* (Erickson et al. 2009).

Uma alternativa sugerida para o controle da transmissão de infecções, é o uso da tecnologia envolvendo alteração genética de bactérias as quais irão expressar proteínas com propriedades anti-parasitárias (Yoshida et al. 2000; Riehle et al. 2006; Djadid et al. 2011).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a microbiota de caramujos da espécie *B. glabrata*, para que, de posse destas informações, novas estratégias de controle da esquistossomose sejam propostas.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, com aproximadamente 10 mm de diâmetro foram divididos em dois grupos. Um grupo foi composto por 30 caramujos selvagens, provenientes da Vila Sotave em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil, e outro grupo, por 30 caramujos não selvagens, mantidos no Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ, Pernambuco, Brasil.

Manutenção dos caramujos

Os caramujos não selvagens foram alimentados semanalmente com alface *ad libitum* e a água, sem hipoclorito de sódio, dos aquários foi trocada com a mesma frequência, ou de acordo com a necessidade. Foram submetidos a um fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro, considerando o período de luz das 6h:00 às 18h:00 e foram mantidos no laboratório durante cerca de oito meses. Já os caramujos selvagens foram coletados do campo e processados no dia seguinte.

Manipulação dos caramujos

Apenas caramujos intactos com capacidade de locomoção foram analisados. Todos os procedimentos experimentais foram realizados por técnica asséptica de acordo com a metodologia de Ducklow et al. (1979), com modificações. Os moluscos foram previamente colocados em contato com a solução anestésica: Hypnol a 0,04% durante cerca de 6 a 8 horas. Passado esse período, realizou-se a assepsia da concha de cada molusco com álcool a 70% e, o caramujo foi posteriormente colocado em placa de Petri estéril e suavemente prensado entre duas lâminas de vidro estéreis, para que ocorresse a quebra da sua concha. Os fragmentos da concha foram removidos com o auxílio de pinças estéreis e o corpo do caramujo transferido para um cadinho estéril contendo 10 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI), onde procedeu-se a homogeneização dessa região com o auxílio de um pistilo estéril, obtendo-se o macerado da parte mole do *B. glabrata*.

Isolamento e identificação bacteriana

Inicialmente, foi realizada a avaliação microbiológica do macerado da parte mole de *B. glabrata* através do semeio deste material nos meios de cultura ágar sangue e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), utilizados para o isolamento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Após o semeio, as placas foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. Após esse período, foram observadas as características fenotípicas das colônias exibidas nos meios de isolamento descritos acima. Foram selecionadas para identificação as colônias predominantes (quatro a cinco colônias apresentando as mesmas características) nos meios empregados no estudo.

Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram, para a identificação presuntiva das bactérias encontradas, segundo técnica descrita em Koneman e Winn (2006).

A partir de culturas puras em Brain Heart Ágar (BHA), obteve-se a identificação bioquímica dos isolados bacterianos através do sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux).

Todos os meios de cultura utilizados no presente estudo foram da empresa Himedia (Índia).

Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados em todos os isolados bacterianos identificados, através do método de difusão em disco, de acordo com as normas do CLSI (2011).

Foram utilizados discos de antimicrobianos para bactérias gram-negativas da classe dos β -lactâmicos: cefepime, ceftazidima, amoxicilina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, piperaciclina/tazobactam e meropenem; dos aminoglicosídeos: gentamicina e amikacina; das quinolonas: ciprofloxacina; dos inibidores da via folato: sulfametoxazol/trimetoprim; dos fenicóis: cloranfenicol; e das tetraciclinas: tetraciclina.

Os discos de antimicrobianos utilizados neste estudo foram da empresa Diagnósticos microbiológicos – DME (SENSIDISC).

RESULTADOS

Identificação bacteriana

Em meio de cultura ágar sangue cresceram colônias com aspecto brilhante ou coloração acinzentada, apresentando ou não β -hemólise. Em Ágar EMB foram observadas colônias negras com brilho verde metálico, colônias apresentando centro escuro com bordas claras ou colônias rosadas com aspecto mucóide.

Foram encontradas apenas bactérias gram-negativas nos dois grupos avaliados. Na identificação através do sistema automatizado VITEK 2 os caramujos foram avaliados individualmente, sendo encontrados 11 gêneros bacterianos, observando-se 10 espécies bacterianas no grupo selvagem, onde 7 destas foram exclusivas deste grupo. No grupo não selvagem, encontramos 9 espécies, onde 6 diferiram do grupo selvagem (Tabela 1). Apesar de apresentar uma pequena diferença no número de espécies, foi observada uma grande variação na diversidade bacteriana entre os dois grupos. Das espécies bacterianas encontradas, três mostraram-se comuns aos dois grupos estudados, *Aeromonas sobria* foi encontrada em 20% no grupo selvagem e 30% no grupo não selvagem, *Citrobacter freundii* foi encontrada em 30% no grupo selvagem e 60% no grupo não selvagem e *Enterobacter cloacae* foi encontrada em 50% no grupo selvagem e 20% no grupo não selvagem. *C. freundii* foi a espécie bacteriana mais encontrada no grupo não selvagem, enquanto *E. cloacae* predominou no grupo selvagem (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual dos isolados bacterianos presentes em cada exemplar de *B. glabrata*, nos grupos selvagens e não selvagens após a avaliação de trinta caramujos.

Isolados bacterianos	Selvagens (%)	Não selvagens (%)
<i>Aeromonas sobria</i>	20	30
<i>Citrobacter freundii</i>	30	60
<i>Enterobacter cloacae</i>	50	20
<i>Cupriavidus pauculus</i>	0	10
<i>Rhizobium radiobacter</i>	0	10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10
<i>Citrobacter sedlakii</i>	0	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	10	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	10	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	10	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	10	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	10	0

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi observado que, na maioria dos isolados bacterianos, a resposta aos antimicrobianos foi heterogênea. Dentre os isolados estudados, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram as espécies que apresentaram maior perfil de resistência frente aos antimicrobianos utilizados. A espécie *R. radiobacter* foi a única que apresentou resistência à amicacina. O meropenem foi o único antimicrobiano eficaz frente a todos os isolados. Por outro lado, a amoxicilina foi o antimicrobiano que exibiu menor eficácia frente aos isolados analisados. O isolado *P. mendocina* foi o único que se mostrou sensível a todos os antimicrobianos analisados, com exceção da amoxicilina. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos identificados.

Bactérias	Antimicrobianos														
	CAZ	CPM	GEN	CIP	TET	SUT	CLO	AMO	AMP	PIT	CFL	CFO	CTX	MPM	AMI
<i>A. sobria</i>	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S
<i>C. freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>C. pauculus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>R. radiobacter</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>S. maltophilia</i>	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>C. sedlakii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
<i>A. baumannii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>A. hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>V. vulnificus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>A. salmonicida</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>A. haemolyticus</i>	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
<i>S. paucimobilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>P. mendocina</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; GEN- Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; TET - Tetraciclina; SUT - Sulfametoxazol/Trimetoprim; CLO – Cloranfenicol; AMO – Amoxicilina, AMP – Ampicilina; PIT - Piperaciclina/Tazobactam CFL – Cefalotina; CFO – Cefoxitina; CTX – Cefotaxima; MPM – Meropenem; AMI – Amicacina.

S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos relacionados à caracterização da microbiota de invertebrados envolve mosquitos. Por exemplo, Demaio et al. (1996), ao estudarem a microbiota intestinal de três espécies de mosquitos: *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* e *Psorophora columbiae*, verificaram que as principais espécies encontradas neste trabalho foram *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella* spp. Em nossos estudos com outra classe de invertebrado, observamos também uma grande heterogeneidade bacteriana na microbiota do *B. glabrata* comparando caramujos selvagens e não selvagens, e observamos a presença de gêneros bacterianos comuns aos encontrados por Demaio et al. (1996) como *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp.

Em nosso estudo, exemplares não selvagens de *B. glabrata* apresentaram, predominantemente, *C. freundii* e *A. sobria*, em sua microbiota, exibindo semelhança com os resultados apresentados por Ducklow et al. (1979). Estes autores, utilizando exemplares de *B. glabrata* oriundos de Porto Rico, Santa Lúcia (país insular situado no Caribe) e Guadalupe (ilha do Caribe), verificaram a presença de *Aeromonas* sp. nos dois grupos de caramujos estudados (selvagens e não selvagens). Este fato pode estar relacionado à presença do gênero *Aeromonas* sp. em ambientes aquáticos (Koneman e Winn, 2006). Já na microbiota de *B. glabrata* selvagem, do estudo de Ducklow et al. (1979), o gênero *Enterobacter* sp. foi encontrado apenas no grupo selvagem, enquanto que no presente trabalho, a espécie *E. cloacae* foi encontrada nos dois grupos, predominando no grupo selvagem. *E. cloacae* é uma das espécies mais comumente encontrada em amostras clínicas, fazendo parte da microbiota entérica comensal humana (Koneman e Winn, 2006), explicando, portanto, o fato de ser predominantemente encontrada em caramujos do grupo selvagem cujo hábitat é um ambiente contaminado por fezes humanas.

Em nosso estudo, entre o grupo selvagem o grupo não selvagem houve algumas semelhanças com relação às bactérias encontradas. Bactérias não fermentadoras como *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *R. radiobacter* foram encontradas no grupo selvagem, da mesma forma que outras espécies de não fermentadoras também foram encontradas em exemplares não selvagens como: *P. mendocina*, *S. paucimobilis*.

Villena et al. (2010), estudando outros gastrópodes realizaram um estudo, em Lima (Peru), para comparar a flora bacteriana intestinal e o hepatopâncreas de moluscos da espécie *Helix aspersa* Müller, criados por dois sistemas de produção: intensivo e extensivo. Neste trabalho, eles encontraram 15 gêneros de bactérias divididos em, Gram-positivas: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e Gram-negativas: *Escherichia*,

Citrobacter, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Corroborando com nossos achados onde, analisando a microbiota de caramujos selvagens e não selvagens, encontramos 11 gêneros, porém todos, Gram negativos. No gastrópode estudado por Villena et al. (2010), *Klebsiella* predominou no sistema de criação intensiva, enquanto no sistema extensivo, predominou o gênero *Escherichia*. Nos nossos resultados, o gênero *Citrobacter* e *Aeromonas* predominaram no grupo não selvagem, enquanto no grupo selvagem predominou *Enterobacter*, mostrando que alguns gêneros de bactérias são comuns entre gastrópodes.

A. sobria, uma das espécies de bactéria mais encontrada nos caramujos não selvagens nesse estudo, também tem sido demonstrada como fazendo parte da microbiota intestinal de representante da classe hirudínea em outro trabalho (GRAF, 1998). O gênero *Aeromonas* também está implicado na síndrome leucodérmica em caramujos da espécie *Achantina fulica* (Dean et al., 1970).

C. freundii, bactéria responsável por uma série de doenças em humanos, foi citada em revisão realizada por Farmer et al. (1985) como sendo responsável por possível causa de diarreia e de ocorrências isoladas de infecções extra-intestinais e foi também predominantemente encontrada nos caramujos não selvagens.

Com relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, Pidiyar et al. (2002), ao caracterizarem *Aeromonas culicicola* de intestino médio de *Culex quinquefasciatus*, observaram que esta espécie bacteriana exibiu resistência à ampicilina e sensibilidade à ciprofloxacina, corroborando com nossos achados para outras espécies do gênero *Aeromonas*. No entanto, no mesmo trabalho observou-se resistência a amicacina, contrastando com nossos resultados. Evangelista-Barreto et al. (2006), estudando ostras da espécie *Crassostrea rhizophorea* verificaram que todas as espécies de *Aeromonas* foram sensíveis à ciprofloxacina e ao cloranfenicol, resultado semelhante ao do presente trabalho. No entanto, a maioria destes isolados foi sensível à cefalotina, diferindo dos nossos achados. Dentro do gênero *Aeromonas*, a espécie *A. sobria* exibiu sensibilidade à tetraciclina, assim como observado em nossos resultados. No presente trabalho, verificamos ainda que, no grupo não selvagem, foram encontradas as bactérias com maior perfil de resistência aos antimicrobianos testados (*P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*), um fato curioso, pois as condições em que esses caramujos vivem são bastante controladas, ao contrário dos caramujos selvagens cujo ambiente é contaminado por dejetos humanos contendo bactérias passíveis de resistência a antimicrobianos.

Com relação ao controle biológico, algumas espécies de bactérias vêm sendo empregadas como entomopatógenos, ou seja, microrganismos capazes de combater determinada espécie de inseto. Um exemplo disso é controle microbiano de insetos realizado pelo entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (Bt) que oferece excelentes alternativas como bioinseticida, mostrando-se também um bom candidato à obtenção de formulações comerciais, bem como à engenharia genética de plantas (COSTA et al. 2010). Outro exemplo de controle biológico é o uso da paratransgênese. Contudo, poucos trabalhos vêm sendo realizados, empregando esta técnica (Durvasula et al. 1997; Yoshida et al. 2001; Riehle et al. 2007), envolvendo a modificação genética de microrganismos simbiotes com o objetivo de obter produtos anti-patogênicos, criando mais uma alternativa, para o controle biológico, reduzindo portanto, a capacidade de transmissão da doença pelo vetor.

Os resultados apresentados nesse estudo, são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico, como por exemplo, utilizando a paratransgênese para a erradicação da transmissão do *S. mansoni* pelos caramujos da espécie *B. glabrata*, a partir do conhecimento de sua microbiota. Este é o primeiro estudo que caracteriza a microbiota de *B. glabrata* no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Tropical (UFPE), Laboratório de Microscopia Eletrônica (LIKA/UFPE), Laboratório de Biologia Molecular (Dept. Parasitologia, CPqAM) e o Laboratório de Esquistossomose (Dept. Parasitologia, CPqAM), os quais apresentaram estrutura e equipamentos necessários para o cumprimento dos objetivos referentes ao projeto.

REFERÊNCIAS

- Charrier, M.; Fonty, G., Gaillard-Martine, B. et al. (2006) Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Research*, 39, 669-681.
- Dean, W. W., Mead, A. R. and Northey, W. T. (1970) *Aeromonas liquefasciens* in the Giant African snail, *Achantina fulica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 16, 346-351.
- Demaio, J., Pumpini, C. B., Kent, M. et al. (1996) The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54 (2), 219 – 223.
- Djadid, N. D., Jazayeri, H., Raz, A. et al. (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *Plos One*, december, vol. 6, issue 12.
- Ducklow, H. W., Boyle, P. J., Maugel, P. W. et al. (1979) Bacterial Flora of the Schistosome Vector Snail *Biomphalaria glabrata* *Applied and environmental microbiology*, Oct. 667-672 Vol. 38, No. 4.
- Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panakal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R. B., Richards, F. F., Beard, C. B. (1997) Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 3274-3278, USA.
- Evangelista-Barreto, N. S., Vieira, R. H. S. F., Carvalho, F. C. T. et al. (2006) *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48(3):129-133, May-June.
- Farmer, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W. et al. (1985) Biochemical Identification of New Species and Biogroups of *Enterobacteriaceae* Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 46-76 Vol. 21, No. 1.
- Graf, J. (1999) Symbiosis of *Aeromonas veronii* Biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the Medicinal Leech: a Novel Model for Digestive Tract Associations. *Infection and immunity*, Jan. 1–7 Vol. 67, No. 1.
- Koneman, E. W. and Winn, W. C. (2006) Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1565 p.
- Laboratory Clinical Standards Institute (CLSI) (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. M100–S20. CLSI, Baltimore
- Mouchka, M. E., Hewson I. and Harvell, C. D. (2011) Coral-Associated Bacterial Assemblages: Current Knowledge and the Potential for Climate-Driven Impacts. *Integrative and Comparative Biology*, volume 50, number 4.
- Costa, e. L.N., Lucho, A. P. R., Fritz, L. L. et al. (2010) Artrópodes e bactérias

entomopatogênicos. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento. Ano XI, n 38.

Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N. B., Patole, M. et al. (2002) *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1723-1728.

Riehle, M. A., Moreira, C. K., Lampe, D. et al. (2007) Using bacteria to express and display anti – *Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. International Journal for Parasitology, 37, 595 – 603.

Ribeiro-Costa, C. S. and Rocha, R. M. (2006) Invertebrados: Manual de Aulas Práticas. Editora Holos, MARINONI, L. 81-114, 271 p. Ribeiro Preto.

Svec, P., Devriese, L. A. et al. (2002) Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*. Journal of Applied Microbiology 92, 951–957

Villena, M. A., Morales, S. C., Soto, J. P. et al. (2010) Flora bacteriana del tracto digestivo de caracoles *Helix aspersa* Müller bajo dos sistemas de crianza. Rev Inv Vet Peru 21 (1): 100-105.

Yoshida, S., Daisuke, I., Matsuoka, H. et al. (2001) Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. Molecular & Biochemical Parasitology 113, 89 – 96.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A microbiota bacteriana de *B. glabrata* do grupo selvagem apresentou-se predominantemente composta por *E. cloacae*;
- A microbiota bacteriana de *B. glabrata* do grupo não-selvagem foi composta, predominantemente por *A. sobria* e *C. freundii*;
- *C. freundii*, *A. sobria* e *E. cloacae* foram às espécies encontradas em todos os grupos de caramujos avaliados: selvagens e não-selvagens;
- Todos os isolados bacterianos encontrados no presente trabalho se apresentaram resistentes à amoxicilina, e o meropenem foi o antimicrobiano mais eficaz frente aos isolados analisados.

**RECOMENDAÇÕES E/OU
CONSIDERAÇÕES DA
DISSERTAÇÃO**

7. RECOMENDAÇÕES E/OU CONSIDERAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho, que foi o primeiro desenvolvido no Brasil envolvendo a caracterização da microbiota de *B. glabrata*, pode servir como base para a elaboração de estratégias de controle biológico, visto que traz informações sobre a composição da microbiota deste molusco, cujas bactérias poderão ser empregadas, por exemplo, em tecnologias de modificação genética para a expressão de moléculas com propriedades anti-parasitárias, como a paratransgênese. Diante do exposto neste trabalho, uma das três espécies encontradas nos dois grupos de caramujos selvagens e não selvagens: *C. freundii*, *A. sobria* e/ou *E. cloacae* seriam candidatas potenciais para a utilização em técnicas para controle biológico.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

BARBOSA, F. S. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1995: 314 p.

BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S. M. L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B.; MORAES, C. N. L.; SPINELLI, V. **Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(3): 725-728, mai-jun, 2001.

BEARD, C. B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R. V. **Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** Annu Rev Entomol 47: 123-141.

BRUUN, B.; AAGAARD - HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control: An introduction and annotated bibliography.** World Health Organization, 2008.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para as ciências da saúde.** 5º ed. Editora Guanabara Koogan, p. 127, Rio de Janeiro, 1998.

CHARRIER, M.; COMBET-BLANC, Y.; OLLIVIER, B. **Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata): evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus*.** Can. J. Microbiol. 44: 20-27 (1998).

CHARRIER, M.; FONTY, G.; GAILLARD-MARTINE, B.; AINOUCHE, K.; ANDANT, G. **Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata).** Biological Research, n 39, 669 – 681, 2006.

COIMBRA Jr. C. E. **Susceptibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* do Distrito Federal, Brasil.** Rev. Saúde Pública vol.15 no.5 São Paulo Oct. 1981.

CONTROLE BIOLÓGICO. **Folha Agropecuária. Folha de S. Paulo**, 10 ago. 1985. Disponível em: Fonte: www.geocities.com ou <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-controle-biologico/control-biologico-5.php>. Acesso em: 01 fev. 2012.

COSTA, E. L.N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; F. L. M. **Artrópodes e bactérias entomopatogênicos.** Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento. Ano XI, n 38, 2010.

DEAN, W. W.; MEAD, A. R.; NORTHEY, W. T.; ***Aeromonas liquefasciens* in the Giant African snail, *Achantina fulica*.** Journal of Invertebrate Pathology 16, 346-351, 1970.

DEMAIO, J.; PUMPINI, C. B.; KENT, M.; BEIER, J. C. **The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 54 (2), 219 – 223 1996.

DONG Y, MANFREDINI F, DIMOPOULOS G. **Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites.** PLoS Pathog. 2009 May;5(5):e1000423. Epub 2009 May 8.

DJADID, N. D.; JAZAYERI, H.; RAZ, A.; FAVIA, G.; RICCI, I.; ZAKERI, S. **Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria.** Plos One, december, 2011, vol. 6, issue 12.

DUCKLOW, H. W., BOYLE P. J., MAUGEL P. W., STRONG C., MITCHELL. R. **Bacterial Flora of the Schistosome Vector Snail *Biomphalaria glabrata*** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 1979, 667-672 Vol. 38, No. 4.

DURVASULA, R. V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R. B.; RICHARDS, F. F.; BEARD, C. B. **Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 94, 3274 – 3278, April 1997.

ERICKSON D. L; ANDERSON N. E; CROMAR L. M; JOLLEY A. **Bacterial communities associated with flea vectors of plague.** J Med Entomol. 2009 Nov; 46(6):1532-6.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, F. C. T.; TORRES, R. C. O.; SANT'ANNA, E. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, C. M. F. ***Aeromonas* spp. ISOLATED FROM OYSTERS (*Crassostrea rhizophorea*) FROM A NATURAL OYSTER BED, CEARÁ, BRAZIL** , Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 48(3):129-133, May-June, 2006.

FARMER, J. J.; DAVIS, B. R. ; HICKMAN-BRENNER, F. W.; McWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G. P.; ASBURY, M. A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H. G.; ELIAS, C.; FANNING, G. R.; STEIGERWALT, A. G.; O'HARA, C. M.; MORRIS, G. K.; SMITH, P. B.; BRENNER, DON J. **Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens.** Journal of Clinical Microbiology, Jan. 1985, 46-76 Vol. 21, No. 1.

GASPARINI, E. **Manual de parasitoses intestinais.** Editora Rubio, Rio de Janeiro, p.71-72, 189 páginas, 2004.

GRAF, J. **Symbiosis of *Aeromonas veronii* Biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the Medicinal Leech: a Novel Model for Digestive Tract Associations.** Infection and immunity, Jan. 1999, 1–7 Vol. 67, No. 1.

GOUVEIA, C.; ASENSI, M. D.; ZAHNER, V.; RANGEL, E. F.; OLIVEIRA, S. M. P. **Study on the bacterial midgut microbiota associated to different brazilian**

populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Neotropical Entomology, 37 (5): 597-601 (2008).

GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, C. P.; CONSOLI, R. A. G. B.; AZEVEDO, M. L. L.

Controle biológico: *Helobdella triserialis* Lineata Blanchard, 1849 (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre *Biomphalaria glabrata* SAY, 1919 (Mollusca: Planorbidae), em laboratório. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 17: 481-92, 1983.

GUIMARÃES, G. C.; SOARES, D. M.; ANDRADE, Z. A.; SOUZA, C. P. **Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré-patente e na compatibilidade.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30(4):273-278, jul-ago, 1997.

IGLÉSIAS, J. D. F. **Aspectos Médicos das Parasitoses Humanas.** Editora Medsi, Rio de Janeiro, 188-189, 483 p., 1997.

JAWETZ, MELNICK & ADELBERG. **Microbiologia médica.** 24 ed. Rio de Janeiro. Editora: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2009.

JOBIN, W. R.; BROWN, R. A.; VÉLEZ, S. P.; FERGUSON, F. F. JOBIN, W. R.; BROWN, R. A.; VÉLEZ, S. P.; FERGUSON, F. F. **Biological control of *Biomphalaria glabrata* in major reservoirs of Puerto Rico.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 26, n 5 1977. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 26, n 5 1977.

KONEMAN, E. W. and WINN, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1565 p.

LABORATORY CLINICAL STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement.** M100–S20, 2011, CLSI, Baltimore.

MAGALHÃES, L. A.; DIAS, L. C. S. **Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (sp), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP).** Revista de Saúde Pública, São Paulo, 1973, 7: 295-7

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE).** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais técnicos. Pág.11-12, 2º ed. Editora MS, Brasília-DF, 2008.

MOUCHKA, M. E.; HEWSON I. and HARVELL, C. D. **Coral-Associated Bacterial Assemblages: Current Knowledge and the Potential for Climate-Driven Impacts.** Integrative and Comparative Biology, volume 50, number 4, 662–674.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana.** 11th edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, S. M.; MORAIS, B. A.; GONÇALVES, C. A.; Giordano – Dias, C. M.; . L.; d'ALMEIDA, J. M.; ASENSI, M. D.; MELLO, R. P.; BRAZIL, R. P. **Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes do campo.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33(3):319-322, mai-jun, 2000.

OLIVEIRA, S. M. P.; MORAIS, B. A.; GONÇALVES, C. A.; Giordano – Dias, C. M.; VILELA, M. L.; BRAZIL, R. P.; d'ALMEIDA, J. M.; ASENSI, M. D.; MELLO, R. P. **Microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentadas com sangue e com sangue e sacarose.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(1):229-232, jan-fev, 2001.

PIDIYAR, V.; KAZNOWSKI, A.; NARAYAN, N. B.; PATOLE, M.; SHOUCHE, Y. S. ***Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52, 1723-1728.

REY, Luis. **Bases da parasitologia médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. **Invertebrados: Manual de Aulas Práticas.** Editora Holos, MARINONI, L. pág. 81, p.81-114, 271 p. Ribeiro Preto, 2006.

RIEHLE, M. A.; MOREIRA, C. K.; LAMPE, D.; LAUZON, C.; JACOBS-LORENA, M. **Using bacteria to express and display anti – *Plasmodium* molecules in the mosquito midgut.** International Journal for Parasitology, 2007, 37 595 – 603.

ROMALDE, J.L.; BARJA, J.L. **Bacteria in molluscs: good and bad guys,** FORMATEX RESEARCH CENTRE, 2010

SANTOS, M. A. V.; RODRIGUES, I. R. C. **Estudo in vitro da ação letal da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* sobre os miracídios de *Schistosoma mansoni*.** Revista Paraense de Medicina, v. 20 (2) abril – junho 2006.

SVEC, P.; DEVRIESE, L. A.; SEDLACEK, I.; BAELE, M.; VANCANNEYT, M.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J.; DOSKAR, J. **Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*.** Journal of Applied Microbiology 92, 951–957, 2002.

TELES, H. M. S. **Sobre o encontro de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) em dois municípios do estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Saúde Pública vol. 20 no. 3 São Paulo, Junho, 1986

VERONESI, R. **Tratado de infectologia.** 3ª edição, São Paulo. Editora: Atheneu, 2005.

VILLENA, M. A.; MORALES, S. C.; SOTO, J. P.; ENCISO, M. H. **Flora bacteriana del tracto digestivo de caracoles *Helix aspersa* Müller bajo dos sistemas de crianza.** Rev Inv Vet Peru 2010; 21 (1): 100-105.

YOSHIDA, S.; DAISUKE, I.; MATSUOKA, H.; ENDO, H.; ISHII, A. **Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes.** Molecular & Biochemical Parasitology, 2007, 113, 89 – 96.

XI, RAMIREZ JL, DIMOPOULOS G (2008) **The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection.** PLoS Pathog 4(7): e1000098. Doi:10.1371/journal.ppat.1000098.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Caracterização do sistema imune e identificação de receptores de membrana e moléculas solúveis presentes em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea*"

Pesquisador responsável: Fábio André Brayner dos Santos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 18/02/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 02/08

Registro no CAAE: 0002.0.095.000-08

PARECER Nº 011/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 07 de março de 2008.


Aideny Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

ANEXO B – Normas da Revista

Journal of Applied Microbiology
© 2012 The Society for Applied Microbiology



Edited By: A. Gilmour

Impact Factor: 2.365

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2010: 55/107 (Microbiology); 64/160
(Biotechnology & Applied Microbiology)

Online ISSN: 1365-2672

Associated Title(s): [Letters in Applied Microbiology](#)

Author Guidelines

Journal of Applied Microbiology publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, Journal of Applied Microbiology updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research. [Click here to read the Editorial announcing the new Aims and Scope.](#)

CONTACTS AND QUICK LINKS

[Author submission checklist](#)

[Contact the Managing Editor](#)

[Contact the Production Editor](#)

[Submit your manuscript now to Journal of Applied Microbiology](#)

[Click here to download the Exclusive Licence Form](#)

[Click here to download the Colour Work Agreement Form](#)

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and

relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper in the Journal. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Managing Editor who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in Letters in Applied Microbiology. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley-Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Chief Editor, in the manuscript (in the

Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example in vitro biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript.

Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript.

Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information. Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Exclusive licence

Manuscripts are accepted on the understanding that the Journal is granted exclusive licence to publish them. Please [click here](#) to download the Exclusive Licence Form.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, [click here](#).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the [payment form](#). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the Journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Referrals to the Open Access Journal MicrobiologyOpen

This journal works together with Wiley's open access journal, [MicrobiologyOpen](#), to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of MicrobiologyOpen.

MicrobiologyOpen is a Wiley open access journal and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. All original files that you upload will be available for the Managing Editor to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal?
2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification in their cover letter, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;

INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;

MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material.

In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).

RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;

DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;

ACKNOWLEDGEMENTS: Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;

REFERENCES;

SUPPORTING INFORMATION (if applicable): Authors wishing to submit supporting information (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material.

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* 39, 127-135.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM_CWAF.pdf and should be sent to the Managing Editor on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors'

www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. Germ-free implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants.

Conventional animals have a full complement of associated microbes. Open conventional animals are housed in a standard animal house. Isolator conventional animals are maintained in isolators and associated with full flora. Ex-germ-free animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them.

Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.