

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA DIAS RODRIGUES VALCANAIA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A  
ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA  
PRODUTIVA DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

PALOTINA

2021

CAROLINA DIAS RODRIGUES VALCANAIA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A  
ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA  
PRODUTIVA DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Coorientador(a): Dra. Cibeli Viana

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V141 Valcanaia, Carolina Dias Rodrigues  
Caracterização do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* em uma cadeia produtiva de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Carolina Dias Rodrigues Valcanaia – Palotina, 2021.  
59f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot  
Coorientadora: Cibeli Viana  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1.Aquicultura. 2.Multidroga resistentes. 3.ESBL. 4. Ambiente.  
5. Humano. 6. Animal. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Viana,  
Cibeli. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA DIAS RODRIGUES VALCANAIA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE Escherichia coli EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE TILÁPIA-DO-NILO (Oreochromis niloticus)**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 17 de Junho de 2021.

Assinatura Eletrônica

17/06/2021 15:28:02.0

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/06/2021 18:17:10.0

LUÍS AUGUSTO NERO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

Assinatura Eletrônica

17/06/2021 15:42:38.0

RICARDO SEITI YAMATO GI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 97100

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 97100

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, sempre presente na minha vida, renovando a cada dia minhas forças e disposição para continuar firme e seguindo em frente, mesmo diante de todos os desafios.

A minha mãe, Mirian, pela dedicação incondicional na minha educação. Por sempre estar presente em minha vida, pelo amor, carinho e zelo, ao longo de todos esses anos, além do apoio, do incentivo e da segurança que sempre me transmitiu para eu vencer as dificuldades.

Ao meu esposo Felipe, pelo apoio, por entender a ausência nos momentos em que foi necessária dedicação exclusiva aos estudos e por estar sempre presente enfrentando todos os desafios ao meu lado. Obrigada por todo amor, incentivo e compreensão!

A minha família principalmente ao meu irmão, Andre e as minhas primas Amanda e Larissa. Como é bom ter pessoas que sempre te animam, que te aconselham, que te escutam e te apoiam. Eu amo muitos todos vocês.

À Universidade Federal do Paraná – Palotina e ao LACOMA que abriram as portas para mim. Onde eu tive a oportunidade de crescer e me desenvolver, me tornando quem eu sou hoje. A todos os colegas que eu tive a oportunidade de trabalhar, entre residentes, mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos, estagiários, e iniciações científicas. Toda a troca de conhecimento e ensinamentos, eu irei levar para vida toda.

Um agradecimento especial ao professor Luciano dos Santos Bersot pela orientação desde o estágio curricular, até a residência e mestrado. Obrigada pela importante contribuição ao longo de todos esses anos para a minha formação profissional e construção pessoal.

A Cibeli Viana, que foi minha coorientadora, muito obrigada por todo apoio intelectual e pessoal ao longo de todos esses anos. Eu te admiro muito e sou muito grata por toda ajuda.

Também sou grata a Kadigia que foi a minha “mãe” na microbiologia de alimentos, que sempre estava disposta a ensinar quantas vezes fossem necessárias. Uma pessoa que sempre me apoiou e me incentivou na área.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos Professores Ricardo Seiti Yamatogi e Luís Augusto Nero, por todo apoio intelectual, pela parceria no projeto e por disponibilizar o laboratório e tudo o que foi necessário para a realização das etapas desse trabalho.

À todos do InsPOA-UFV, em especial à Lorena e a Milimani. Pessoas que além de dividir a bancada, também pudemos dividir o nosso lar. Obrigada pela parceria, pelo apoio e saibam que vocês podem contar comigo sempre!

Ao LACQSA em especial a professora Julia Arantes Galvão, que disponibilizou o laboratório para a finalização das análises do meu projeto.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

A indústria de alimentos que cedeu o seu tempo e pessoas para me ajudarem na execução das coletas.

A todos muito obrigada!

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Carolina Dias Rodrigues Valcanaia, filha de Mirian Selma Dias Rodrigues e Renan Carneiro Rodrigues, nascida em 27 de março de 1992 no município de Curitiba, estado do Paraná. Médica Veterinária formada no ano de 2016 pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Residente em Inspeção de Produtos de Origem Animal no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2017-2019). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidos da cadeia de tilapicultura; a verificação de multirresistência a drogas antimicrobianas (MDR) e a avaliação da produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) através da técnica da sinergia de duplo disco (DDST). Um total de 584 isolados foi obtido de amostras do ambiente de criação, abate e processamento de tilápias, de produtos finais e de fezes de trabalhadores do frigorífico na região oeste do Paraná, Brasil. Os isolados de *E. coli* foram recuperados de 13 amostras fecais de humanos, 10 amostras de água do tanque representativas da propriedade, 30 amostras de água residuárias do ambiente de abate (*Chiller*, escamadeira e evisceração), 100 amostras de carcaça e 100 de produto final (filé de Tilápia). Na avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, foi possível recuperar 581 isolados, que foram testados frente a 10 antimicrobianos de 10 classes diferentes utilizando a técnica de disco difusão em ágar. Deste total 143 (24,6%) foram resistentes a amoxicilina (AML – 10µg); 110 (18,9%) à azitromicina (AZI 15µg); 49 (8,4%) à tetraciclina (TET - 30µg); 41 (7,1%) à ciprofloxacina (CIP - 5µg); 24 (4,1%) ao sulfametoxazol/trimetopim (SUT - 23,75-1,25 µg); 14 (2,4%) ao imipenem (IMP - 10µg); 12 (2,1%) ao aztreonam (ATM - 30µg) ; 11(1,9%) à gentamicina (GEN - 10µg); sete (1,2%) à ceftiofur (CEF - 30µg) e seis (1%) ao cloranfenicol (CLO 30µg). Mesmo tendo ocorrido uma baixa distribuição de resistência em relação aos antimicrobianos testados, 257 (44,2%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, demonstrando assim, que a resistência ocorreu de forma ampla no estudo. Em relação a característica MDR 35 (6%) isolados apresentaram essa característica distribuídos em todos os pontos de coleta, principalmente em amostras de carcaça (18) seguido de amostra de filé de Tilápia (5), água residuária do ambiente de abate (4) e amostras de água do tanque (3). Já em relação a análise de DDST, nove isolados (1,5%) foram produtores de ESBL, sendo que sete deles também foram MDR. Foi possível observar que proporcionalmente, o número de amostras que apresentaram isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano foi maior em amostras do ambiente de criação (água do tanque), em que 100% das amostras apresentaram isolados resistentes, seguido de amostras de fezes humanas com 92,3%, amostras de água residuária do ambiente de abate(*chiller*, escamadeira, evisceração) 66,7%, amostras de carcaça 59% e amostras de filé de Tilápia com 35%. Já em relação ao número total de isolados encontrados, nas amostras de fezes humana 70% dos isolados eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, seguido das amostras de carcaça com 50,2%, amostras do ambiente de criação com 46,4%, amostras de água residuária de abate com 39,7%, e amostras de filé de Tilápia. Evidenciando assim, que existe uma distribuição de isolados resistentes no ambiente de produção, no ambiente de abate, nos animais, no produto final e nas fezes humanas.

Palavras-chave: Aquicultura; multidroga resistentes; ESBL; ambiente; humano; animal.

## ABSTRACT

The objective of this study was to perform the phenotypic characterization of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates obtained from the tilapia culture chain; the verification of multiple drug resistance (MDR) and the evaluation of production extended spectrum beta-lactamases (ESBL) through the double disk synergy technique (DDST). A total of 584 isolates were obtained from ten different breeding properties of Nile tilapia and feces of 13 employees, collected in a slaughterhouse in western Paraná - Brazil. *E. coli* isolates were recovered from 13 faecal samples of humans, 10 samples of water from the tank representative of the property, 30 samples of residuary water from the slaughter environment (chiller, fish scaler machine and evisceration), 100 samples of carcass and 100 from the final product of Nile tilapia (tilapia fillet). To perform the phenotypic test to evaluate susceptibility to antimicrobials, it was only possible to recover 581 isolates, which were tested for sensitivity to 10 antimicrobials of 10 different classes using the agar diffusion disk technique. Of the 581 isolates tested, 143 (24.6%) were resistant to amoxicillin (AML - 10µg); 110 (18.9%) to azithromycin (AZI 15µg); 49 (8.4%) to tetracycline (TET - 30µg); 41 (7.1%) to ciprofloxacin (CIP - 5µg); 24 (4.1%) to sulfamethoxazole/trimethopim (SUT - 23.75-1.25 µg); 14 (2.4%) to imipenem (IMP - 10µg); 12 (2.1%) to aztreonam (ATM - 30µg); 11(1.9%) to gentamicin (GEN - 10µg); 7 (1.2%) to ceftiofur (CEF - 30µg); 6 (1%) to chloramphenicol (CLO 30µg). Even though there was a low distribution of resistance in relation to the antimicrobials tested, of the 581 isolates 257 (44.2%) presented resistance to at least one antimicrobial tested, thus demonstrating that the resistance occurred generalized in the study. Regarding the characteristic MDR 35 (6%) isolates presented this characteristic distributed in all the collection points, mainly in carcass samples (18) followed by fillet sample of Tilapia (5), residuary water of the slaughtering environment (4) and water samples of the tank (3). Regarding the analysis of DDST, nine isolates (1.5%) were producers of ESBL, and seven of them were also MDR. It was observed that proportionally, the number of samples presenting isolates resistant to at least one antimicrobial was higher in samples from the breeding environment (tank water), in which 100% of the samples presented resistant isolates, followed by samples of human feces with 92.3%, samples of residuary water from the slaughter environment (chiller, scale remover machine, evisceration) 66.7%, samples of carcass 59% and samples of Tilapia fillet with 35%. In relation to the total number of isolates found, 70% of the isolates were resistant to at least one antimicrobial, followed by 50.2% carcass samples, 46.4% farmed environment samples, 39% residuary slaughter water samples, 7%, and samples of Tilapia fillet. Thus, there is a distribution of resistant isolates in the production environment, in the slaughter environment, in animals, in the final product and in human feces.

Keywords: Aquaculture; resistant multidrug; ESBL; environment; human; animal.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA REPRESENTANDO OS MAIORES PRODUTORES DE TILÁPIA-DO-NILO NO BRASIL .....	15
FIGURA 2 – DESTINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO NA PRODUÇÃO ANIMAL .....	17
FIGURA 3 – PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA .....	24
FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> .....	40
FIGURA 5 – RELAÇÃO DE ISOLADOS TOTAIS E ISOLADOS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS POR ORIGEM DA AMOSTRA QUE FORAM OBTIDOS EM UM ABATEDOURO DE TILAPIAS-DO-NILO NO OESTE DO PARANÁ.....	47
FIGURA 6 - NÚMERO TOTAL DE ISOLADOS RECUPERADOS POR PONTO DE COLETA E O NÚMERO TOTAL E PORCENTAGEM DE ISOLADOS RESISTENTES A CADA ANTIMICROBIANO TESTADO PELA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO COLETADOS EM UM ABATEDOURO NO OESTE DO PARANÁ .....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS PELOS PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE AQUICULTURA E ORGANIZAÇÕES DO MUNDO..	18
TABELA 2 – NÚMERO DE AMOSTRAS, UNIDADE AMOSTRAL E PONTOS DE COLETA DE UM ABATEDOURO DE TILÁPIA-DO-NILO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ .....	36
TABELA 3 – GENE PESQUISADO, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO E TAMANHO ESPERADO DO PRODUTO .....	38
TABELA 4 – TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS, RESPECTIVOS RESULTADOS DE POSITIVIDADE E TOTAL DE CEPAS DE <i>E. coli</i> ISOLADAS DE ACORDO COM A ORIGEM COLETADAS EM UM ABATEDOURO DE TILÁPIA-DO-NILO NO OESTE DO PARANÁ .....	41
TABELA 5 – NÚMERO TOTAL E PORCENTAGENS DE ISOLADOS RESISTENTES E INTERMEDIÁRIOS A 10 ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO, ISOLADOS MULTIDROGAS RESISTENTES (MDR) E ISOLADOS PRODUTORES DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) POSITIVOS DE <i>E. coli</i> DE DIFERENTES ORIGENS DE AMOSTRAS COLETADAS EM UM ABATEDOURO DE TILÁPIAS-DO-NILO DO OESTE DO PARANÁ.....	43
TABELA 6 – PERFIL DE RESISTENCIA DE 35 ISOLADOS DE <i>E. coli</i> MULTIDROGA RESISTENTES E A ORIGEM DA AMOSTRA ANALISADA.....	50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 AQUICULTURA .....	14
2.2 ANTIMICROBIANOS NA AQUICULTURA .....	15
2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	19
2.4 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS .....	20
2.5 MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE TILÁPIA-DO-NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)</b> .....	<b>34</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	35
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.2.1 Amostragem .....	36
4.2.2 Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.2.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos pela técnica do disco-difusão .....	38
4.2.4 Detecção de <i>Escherichia coli</i> produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) pela técnica da sinergia de duplo disco (DDST) .....	39
4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	40
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2017, o pescado representou cerca de 17% do total de proteína animal e 7% de todas as proteínas consumidas pela população mundial. Em relação à aquicultura, nos últimos anos, esse tipo de produção vem aumentando notavelmente, considerando que em 1950 a participação era de apenas 4% e que em 2018 ela chegou a 52% (FAO, 2020). A intensificação dessa produção acaba levando a uma maior concentração de animais em um espaço menor, proporcionando assim, a utilização de substâncias químicas como o uso de antimicrobianos, atualmente empregados para utilização terapêutica e profilática (DIBNER e RICHARDS, 2005).

A utilização desses medicamentos na aquicultura pode oferecer condições para o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (GASTALHO et al., 2014). Independentemente da forma como a resistência é adquirida, o uso de agentes antimicrobianos cria condições adequadas para a emergência e a disseminação de bactérias resistentes (GUARDABASSI e KRUSE, 2010). Essa disseminação ocorre como consequência da transferência horizontal de genes mediada por um conjunto diversificado de elementos de DNA móveis, como plasmídeos, transposões, ilhas genômicas, integrons, bem como transformação natural (AARESTRUP, 2005).

A disseminação ambiental de micro-organismos resistentes expõe diferentes espécies a essas bactérias. Os seres humanos, por exemplo, estão em constante exposição devido ao contato direto durante toda cadeia de produção animal assim como por meio do consumo de alimentos de origem animal. Além disso, a interação dos antimicrobianos com o solo desempenha um papel importante na determinação da sua presença e acúmulo no meio ambiente.

Os antimicrobianos de uso veterinário vêm sendo considerados contaminantes ambientais, uma vez que os medicamentos administrados e seus metabólitos, ou produtos de degradação, atingem o ambiente aquático por meio da aplicação de composto de esterco ou fertilizante líquido em terras agrícolas, por animais criados a pasto excretando diretamente na terra, seguido pelo escoamento, que pode chegar a camadas mais profundas do solo. A maioria dos antimicrobianos é solúvel em água, sendo que cerca de 90% de uma dose pode ser excretada na urina e até 75% nas fezes de animais (HALLING-SØRENS, 2002). Gullberg et al. (2011) demonstraram que para vários antimicrobianos utilizados clinicamente, as concentrações encontradas em ambientes naturais podem selecionar bactérias

resistentes. Esses resultados sugerem que a liberação desses antimicrobianos no meio ambiente pode contribuir significativamente para o surgimento e manutenção de resistência (GULLBERG et al., 2011).

Já no Brasil, a produção de peixes de cultivo vem aumentando a cada ano e praticamente toda a produção é direcionada ao mercado doméstico, sendo a Tilápia-do-Nilo a espécie mais produzida no país. Tendo em vista que em 2020 o Brasil foi o 4º maior produtor de Tilápia-do-Nilo no mundo (SOUZA, 2021), programas de monitoramento de resistência a antimicrobianos são muito importantes. Contudo, apesar desse crescimento e, logo, do papel que o país ocupa na aquicultura, são poucos os estudos realizados para monitorar a frequência de resistência antimicrobiana.

Conforme os dados do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (Prebaf) é possível verificar vários níveis de resistência/multirresistência a antimicrobianos de importância clínica na cadeia avícola (BRASIL, 2012), demonstrando, dessa forma, a necessidade de implementar o monitoramento para outras cadeias produtivas e, assim, identificar as possíveis rotas de transferências de cepas resistentes entre o ambiente, animais, alimentos, manipuladores e conseqüentemente os consumidores finais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AQUICULTURA

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), aquicultura pode ser definida como a criação de organismos aquáticos incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas. Esse tipo de produção segue crescendo, estima-se, inclusive, que a produção global de peixes tenha atingido cerca de 179 milhões de toneladas em 2018, sendo a Ásia o maior continente produtor com 66% e a China o país que mais produziu, com 16%. Nesse mesmo ano, o continente americano contribuiu com 5% do total de produção aquicultural, sendo que o Brasil correspondeu com 2% desse montante de produção, ocupando a 13ª posição no ranking mundial (FAO, 2020).

A Associação Brasileira da Piscicultura, entidade que reúne todos os segmentos da cadeia da produção de peixes de cultivo no país, atestou que a produção brasileira de peixes de cultivo atingiu 802.930 toneladas em 2020, um crescimento de 5,93% em relação ao ano anterior (758.006 toneladas) (SOUZA, 2021).

Além dessa produção de cultivo atender majoritariamente o mercado doméstico, a Tilápia-do-Nilo é a espécie que lidera o ranking entre os peixes mais produzidos no país, com crescimento de 11,5%, atingindo 486.155 toneladas em 2020 (contra 432.149 toneladas do ano anterior) (FIGURA 1). A região que lidera a produção de Tilápia-do-Nilo no Brasil é o Sul, com 44% do total (213.351 toneladas). Entre seus estados, o destaque absoluto é o Paraná, com 166.000 toneladas.

FIGURA 1 - MAPA REPRESENTANDO OS MAIORES PRODUTORES DE TILÁPIA-DO-NILO NO BRASIL.



Fonte: Elaboração da autora a partir das informações dispostas em Souza, 2021.

## 2.2 ANTIMICROBIANOS NA AQUICULTURA

A produção de Tilápia-do-Nilo pode ocorrer tanto em tanques rede, onde os peixes ficam em gaiolas sendo produzidos em rios, quanto em tanques escavados, que são mais comuns além de estarem integrados a outras atividades agropecuárias. Dessa forma, a aquicultura tem a possibilidade de produzir maiores quantidades de produtos em um espaço reduzido, se comparado com a captura selvagem de espécies. Porém, essa prática intensiva e semi-intensiva leva a uma maior concentração de animais em pequenos espaços, o que aumenta substancialmente o risco de doenças devido à alta densidade de animais, tornando o sistema cada vez

mais dependente de insumos químicos, principalmente os antimicrobianos (GARCIA et al., 2013).

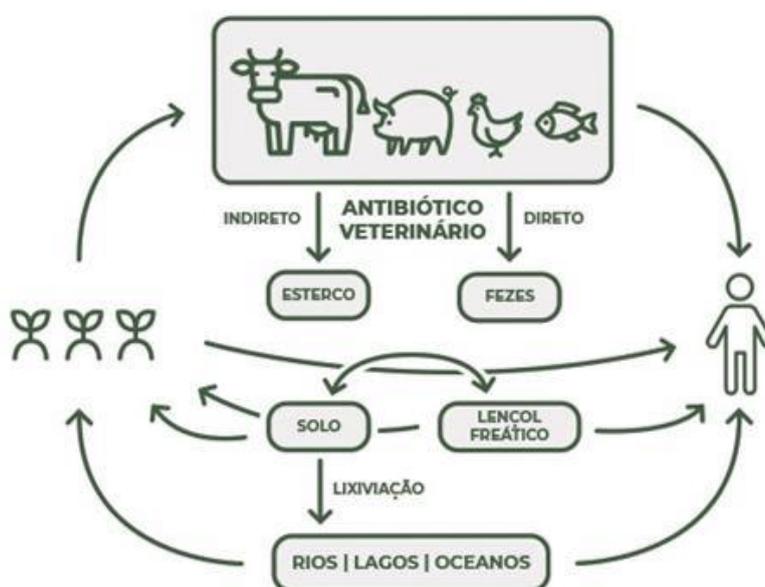
Os antimicrobianos são frequentemente utilizados na prática veterinária para o tratamento de infecções bacterianas de animais, no uso profilático (SERRANO 2005; CABELLO 2006; GAO et al., 2012; RICO et al. 2012; SONG et al., 2016) ou como promotores de crescimento (CHOWDHURY et al ., 2009). Esse grupo de compostos naturais ou sintéticos atua matando ou inibindo a multiplicação de micro-organismos (SAPKOTA et al., 2008). Na produção aquícola, os antimicrobianos vêm sendo utilizados por mais de 50 anos (SHAMSUZZAMAN e BISWAS, 2012), esses agentes antibacterianos são utilizados principalmente com o objetivo de tratar infecções em peixes. Assim, após a utilização desses produtos, o peixe não pode ser destinado para alimentação antes do término do período de carência. O tempo de retirada dos peixes para abate varia principalmente em função do antimicrobiano utilizado e da temperatura da água em que se encontra, variando entre 3 e 42 dias (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010). Ainda que os animais passem por um período de carência adequado, outras preocupações têm sido levantadas em relação às questões de saúde pública sobre a ocorrência de resíduos de antimicrobianos na cadeia alimentar. É importante lembrar que, alimentos consumidos por longos períodos, contendo baixas concentrações de antimicrobiano, podem levar à ocorrência de micro-organismos resistentes aos medicamentos (FERNANDEZ-TORRES et al., 2011).

Além do uso de forma terapêutica na aquicultura, os antimicrobianos também são utilizados de forma profilática, principalmente na fase de larinocultura. Essa prática é realizada com o objetivo de evitar infecções, geralmente nas fases iniciais de cultivo em razão da baixa resistência dos peixes a agentes agressores nessas fases. Por exemplo, na aquicultura de camarão e salmão, há um importante uso de antimicrobianos profiláticos no ambiente aquático de rios, lagos e oceanos (GRAVE et al., 1999; LE e MUNEKAGE, 2004; Le et al., 2005). Entretanto, essa prática pode aumentar a resistência bacteriana contra os antimicrobianos, levando ao aparecimento de bactérias cada vez mais difíceis de serem controladas com o uso de antimicrobianos (CABELLO, 2006).

A maneira mais comum de administração de agentes antimicrobianos na aquicultura é no uso desses medicamentos na ração para os peixes que, como consequência, acaba adicionando esses compostos diretamente na água. Essa prática resulta na utilização intensa de agentes antimicrobianos e transferência de

grande quantidade para os animais e ambiente (FIGURA 2). Assim como foi observado em outros ambientes industriais da pecuária (ANDERSON et al., 2003; ANGULO et al., 2004; NANDI et al., 2004), esse uso resultou em um aumento da resistência a antimicrobianos para as bactérias ambientalmente relevantes (RHODES et al., 2000 a; MIRANDA e ZEMELMAN, 2002; PETERSEN et al., 2002; ALCAIDE et al., 2005 HEUER et al., 2009). Além do surgimento de resistência a antimicrobianos entre os patógenos importantes para aquicultura prejudicando a eficácia do uso profilático nessa cadeia (L'ABEE - LUND e SØRUM, 2001; SØRUM, 2005).

FIGURA 2 - DESTINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO NA PRODUÇÃO ANIMAL.



Fonte: elaboração da autora. (2021)

Uma vez no ambiente aquático, os antimicrobianos podem ter efeitos tóxicos em espécies selvagens não-alvo e afetar a saúde dos trabalhadores agrícolas (BUSINESS, 2003). Esses medicamentos também podem interromper os processos iniciais de desenvolvimento do zooplâncton (PARK e KWAK, 2018) além da produção de clorofila do fitoplâncton (SONG et al., 2016). Logo, essas mudanças podem alterar a cadeia alimentar, provocando consequências em todos os níveis do ecossistema. Além disso, os antimicrobianos têm sido associados com crescimento prejudicado assim como a imunossupressão (MAQSOOD et al., 2011), além da microbiota intestinal alterada em espécies de aquicultura (HE et al., 2012). Outro fator importante é como a ligação entre sistemas de aquicultura, com rios lagos e oceanos, pode

desencadear o aparecimento de bactérias resistentes em todos esses locais (ZHANG et al., 2014).

Em relação aos antimicrobianos autorizados para uso na aquicultura em geral são Oxitetraciclina, Florfenicol, Sarafloxacina, Octromicina, Sulfonamidas potencializadas com Trimetoprim ou Ormetoprim (SERRANO, 2005), porém, esses princípios ativos podem alterar de acordo com cada país (TABELA 1). No Brasil, por exemplo, os antimicrobianos são utilizados somente de forma terapêutica, sendo os princípios ativos licenciados disponíveis para a criação de peixes o Florfenicol e a Oxitetraciclina, e apenas o Florfenicol é recomendado para a criação de Tilápia-do-Nilo (REDA et al., 2013).

TABELA 1 – ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS PELOS PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE AQUICULTURA E ORGANIZAÇÕES DO MUNDO.

Local	Total	Antimicrobianos utilizados	Referência
China	3	Clortetraciclina; trimetoprim; oxitetraciclina; tetraciclina; sulfonamidas de ácido oxolínico etc.	Mo et al. (2017); Lulijwa et al. (2019).
Vietnam	9	Amoxicilina; benzilpenicilina; ciprofloxacina; cloxacilina; colistina; clortetraciclina etc.	Lulijwa et al. (2019).
Coreia do Sul	7	Amoxicilina; ciprofloxacina; clortetraciclina; enrofloxacina; eritromicina; florfenicol etc.	Lulijwa et al. (2020).
Tailândia	4	Amoxicilina; enrofloxacina; norfloxacina; oxitetraciclina; ormetoprim; penicilina etc.	Lulijwa et al. (2020).
Bangladesh	2	Amoxicilina; clortetraciclina; doxiciclina; eritromicina; oxitetraciclina; penicilina G etc.	Hossain et al. (2017); Ali et al., (2016).
Inglaterra	5	Oxitetraciclina; ácido oxolínico; amoxicilina; sarafloxacina e cotrimazina.	Alderman e Hastings (1998).
Itália	6	Tetraciclina; oxitetraciclina; amoxicilina; flumequina e sulfadiazina/trimetoprim.	Labella et al. (2013).
Brasil	2	Florfenicol e oxitetraciclina.	Reda et al., (2013)
Estados Unidos	4	Oxitetraciclina; florfenicol; sulfadiazina/trimetoprim e sulfadimetoxina/ormetoprim.	Dawood et al. (2017)
Chile	9	Oxytetraciclina; Florfenicol; Amoxicilina; Ácido Oxolínico; Cloranfenicol; Eritromicina; Gentamicina; Flumequinine e Furazolidona.	Cabello et al. (2013)
FDA	4	Florfenicol; oxitetraciclina e sulfadimetoxina/ormetoprim.	<a href="https://www.fda.gov/animalveterinary/developmentapprovalprocess/aquaculture/ucm132954.htm">https://www.fda.gov/animalveterinary/developmentapprovalprocess/aquaculture/ucm132954.htm</a>
FAO 2005	5	Florfenicol; oxitetraciclina; sarafloxacina; eritromicina e sulfonamidas.	<a href="http://www.fao.org/3/a-a0282e.pdf">http://www.fao.org/3/a-a0282e.pdf</a>

Fonte: elaboração da autora (2021).

Regionalmente, o Vietnã (39) e a China (33) lideram a Ásia em número de compostos antimicrobianos usados na aquicultura. Em comparação, o número de compostos antimicrobianos usados na Coreia, Tailândia e Bangladesh é menos diversificado. Isso pode estar associado à necessidade de atender aos rígidos requisitos do mercado de exportação de resíduos de antimicrobianos para a Europa, Japão e EUA. Além disso, os medicamentos mais frequentemente relatados foram: sulfadiazina, sulfametoxina, amoxicilina e florfenicol (MO et al., 2017; LULIJWA et al., 2020).

Já na Europa, os antimicrobianos mais utilizados são a oxitetraciclina e amoxicilina. Na Noruega e na Dinamarca, existem dois programas de monitoramento que fornecem dados do uso de antimicrobianos na aquicultura em uma base anual: o Programa de Pesquisa e Monitoramento da Resistência Antimicrobiana Integrado Dinamarquês (DANMAP) e o Ministério da saúde da Noruega (NORM-VET), (KORSGAARD et al., 2019; TROMSØ, 2020). Nesses relatórios é possível observar que os antimicrobianos mais utilizados em 2019 foram Sulfonamidas e Trimetoprim na Dinamarca e o Florfenicol na Noruega. Embora seja possível observar a diminuição dos agentes antimicrobianos a cada ano, devido principalmente ao uso de vacinas eficazes nas fases iniciais da produção, a terapia antibacteriana ainda é a última opção para combater as infecções bacterianas na aquicultura (MCCORMACK, 2009).

Nas Américas, é possível observar a utilização de seis tipos de antimicrobianos aplicados pelo Chile e dois pelo Brasil, onde os produtores aplicaram principalmente oxitetraciclina e florfenicol. Além disso, uma revisão recente sobre o uso de antimicrobianos no Chile confirma que o florfenicol e a oxitetraciclina dominam a indústria de criação de Salmão (LOZANO et al., 2018). Já no Brasil não existe um monitoramento específico em relação à quantidade de medicamentos utilizados, e poucos estudos foram realizados sobre resistência a antimicrobianos na piscicultura, conforme apresentado na introdução.

### 2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A correlação entre o uso intensivo de agentes antimicrobianos e a seleção de bactérias resistentes está bem documentada para bactérias patogênicas (MCEWEN et al., 2005; EFSA, 2009). Entretanto, há menos informações sobre o impacto nas bactérias comensais que comumente colonizam o trato intestinal de humanos e

animais ou estão no ambiente. A microbiota endógena pode desempenhar um papel importante como receptora e doadora de genes de resistência a antimicrobianos. Essa troca genética pode ocorrer na transferência horizontal de genes e na transferência de fragmentos de DNA (elementos genéticos móveis) sendo esse, provavelmente, o principal mecanismo genético de disseminação e co-seleção de genes de resistência, embora outros mecanismos como mutações compensatórias ou adaptativas também possam estar envolvidos (BECEIRO et al., 2013; ROLAIN, 2013; SOMMER et al., 2009).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos incluem a inativação do antimicrobiano por síntese de enzimas (por exemplo,  $\beta$ -lactamases), a diminuição da concentração intracelular (por redução da permeabilidade da membrana externa em Gram-negativos ou bombas de efluxo) e a alteração do local ativo.

*Escherichia coli* é comumente encontrada no trato intestinal de humanos, animais e no ambiente (PORMOHAMMAD et al., 2019). Como consequência, o nível de resistência aos antimicrobianos em *E. coli* representa um indicador útil da disseminação da resistência em populações bacterianas (TADESSE et al., 2012; ALLEN et al., 2013). As vantagens de monitorar a resistência em bactérias comensais como *E. coli* estão relacionadas a sua alta prevalência e ao fácil isolamento (ALLEN et al., 2013) em comparação com bactérias patogênicas. Na literatura é possível encontrar alguns relatos sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* de humanos saudáveis (NYS ET AL., 2004; PALLECCHI et al., 2007; BAYLEI et al., 2010) ou animais (KAESBOHRER et al., 2012; WASYL et al., 2013; HESP et al., 2019), porém em poucos estudos foi realizada a comparação entre amostras de animais, humanos e ambiente.

#### 2.4 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

Desde a sua descoberta por Alexander Fleming em 1928, os antimicrobianos têm sido um importante aliado no tratamento de doenças infecciosas (VERMELHO et al., 2019). Essas substâncias podem atuar de diversas maneiras, interferindo nos processos metabólicos ou na estrutura do micro-organismo. Os principais mecanismos de ação agem na parede celular, na replicação cromossômica, na inibição da síntese proteica e inibição metabólica (BARROS et al., 2013).

A penicilina (amoxicilina), cefalosporina (ceftiofur), monobactam (aztreonam) e carbapenem (imipenem) inibem a síntese (crescimento e reparo) da parede celular das bactérias. Quando o fármaco interfere na estrutura da parede celular, a bactéria não resiste às pressões osmóticas e morre. A fluoroquinolona (ciprofloxacina) interfere na síntese de DNA e quando esse processo é interrompido, a célula bacteriana é incapaz de se reproduzir e morre (BARROS et al., 2013).

A tetraciclina (tetraciclina), fenicois (cloranfenicol), aminoglicosídeo (gentamicina) e macrolídeo (azitromicina) são agentes antibacterianos que interferem na produção de proteínas nas células bacterianas, inibindo a síntese das proteínas o que faz a bactéria não conseguir se multiplicar e, assim, morrendo (BARROS et al., 2013).

Os inibidores de folato (sulfametazol/trimetopim) são principalmente bacteriostáticos (retardam o crescimento), em virtude de sua capacidade de inibir a atividade do ácido fólico no metabolismo das células bacterianas. Uma vez reduzida a velocidade de multiplicação das bactérias, os próprios mecanismos de defesa do corpo (leucócitos) são capazes de livrar o corpo dos micro-organismos invasores, controlando, dessa forma, a infecção (FORD et al., 2019).

## 2.5 MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana pode ser dividida em intrínseca (ou natural) ou adquirida. A resistência intrínseca é gênero e, muitas vezes, espécie-específica, o que determina o espectro de ação do antibiótico. A resistência adquirida, por sua vez, pode se manifestar em apenas algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana. Ela resulta da mutação em algum gene cromossomal ou mesmo plasmidial ou da aquisição de novo material genético pela bactéria, principalmente devido aos mecanismos de conjugação ou transformação. Enterobactérias são resistentes intrinsecamente a Penicilina G, vancomicina, teicoplanina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, clindamicina, linezolid, quinopristina/dalfopristina, mupirocina, ácido fusídico (BARROS et al., 2013).

O cromossomo bacteriano contém a informação necessária para replicação, crescimento e outras funções celulares. A informação genética no cromossomo organiza-se na forma de genes, que são formados por sequências de bases nucleotídicas, as quais codificam os aminoácidos constituintes das proteínas. Cada

gene possui a informação necessária para codificar uma proteína. Algumas bactérias possuem DNA extracromossomal em forma de plasmídeos, os quais contêm informação genética adicional que pode estar relacionada à resistência aos antimicrobianos, à produção de toxinas e/ou de outros fatores de virulência. Microorganismos que contêm plasmídeos com marcadores de resistência podem, portanto, ser selecionadas em uma população bacteriana pelo uso de antimicrobianos (BARROS et al., 2013).

As alterações genéticas na célula bacteriana podem ocorrer em decorrência de mutações, aquisição de elementos genéticos móveis e mecanismos de recombinação homóloga. As mutações podem ocorrer no DNA cromossômico por deleção ou por alteração na sequência das bases nucleotídicas. Também podem acontecer naturalmente ou por influência de agentes químicos ou físicos. O resultado das mutações, então, é a formação de proteínas incompletas ou inativas, que podem alterar o fenótipo celular (BARROS et al., 2013).

Além disso, também existem segmentos do DNA bacteriano que são móveis e podem entrar no cromossomo ou no plasmídeo. Essas sequências de DNA (*jumping genes*) são genericamente denominadas elementos de inserção (*insertion sequence* – *IS elements*). Esses elementos se inserem no cromossomo, podendo induzir a expressão de alguns genes ou sua inativação. Em decorrência disso, pode haver perda de alguma característica fenotípica da célula, como a habilidade de fermentar um determinado açúcar ou a expressão de um fenótipo que não era observado anteriormente, como a resistência a um determinado antimicrobiano (BARROS et al., 2013).

Transposons e integrons são outras formas de IS que frequentemente carregam genes de resistência a antibióticos e também podem se localizar em plasmídeos ou no cromossomo. A diferença entre esses elementos está no seu tamanho, em pares de bases, e na presença de genes que codificam enzimas específicas para sua ligação ao cromossomo. As bactérias podem transferir ou receber material genético pelo fenômeno de recombinação entre regiões homólogas de DNA. A recombinação bacteriana altera o genótipo e pode causar significativas alterações no fenótipo celular. Essa troca do material genético pode ocorrer por meio de transformação, de transdução ou de conjugação (BARROS et al., 2013).

Transformação é a entrada de DNA diretamente pela parede celular. Uma vez dentro da célula, a fita dupla de DNA pode ser reduzida a uma fita simples e se

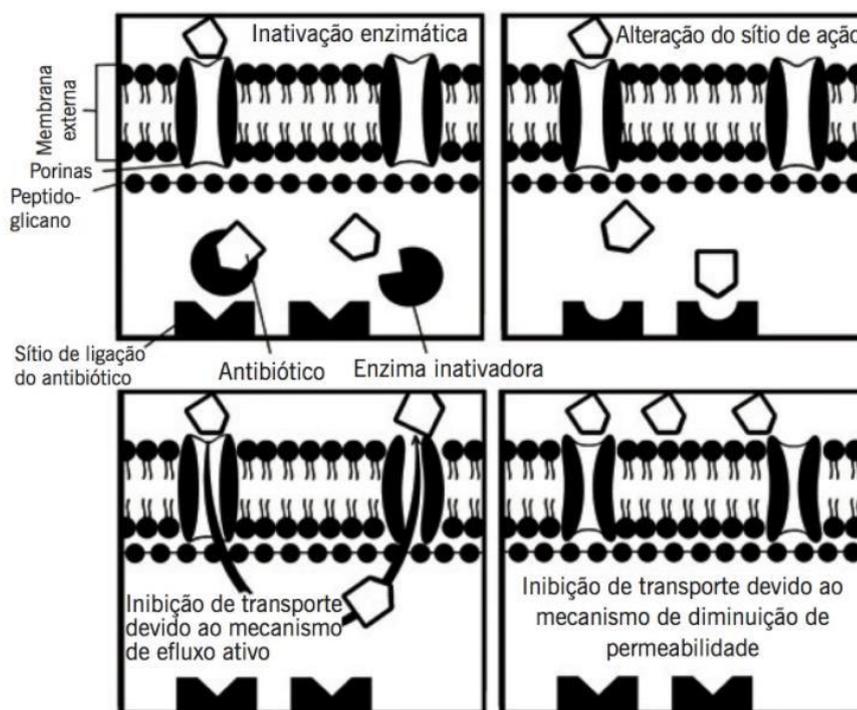
recombinar no cromossomo bacteriano. Os plasmídeos também podem penetrar na parede celular, replicar no citoplasma e, então, ser transmitidos a células-filhas. As células bacterianas que são capazes de receber DNA extracelular são denominadas “competentes” (BARROS et al., 2013).

Transdução é a transferência de material genético via bacteriófago (vírus bacteriano) entre células distintas. Os bacteriófagos são constituídos de DNA ou RNA e de uma capa proteica. Quando infectam a célula bacteriana, os bacteriófagos injetam o material genético diretamente dentro da célula, deixando a capa proteica no lado externo. A infecção por bacteriófagos pode levar à lise bacteriana (ciclo lítico) ou à simples recombinação do material genético com o cromossomo bacteriano (ciclo lisogênico). Durante a lisogenia, os genes oriundos de bacteriófagos podem ser expressos pela célula bacteriana (BARROS et al., 2013).

Conjugação é o processo em que o material genético é transferido de uma célula bacteriana diretamente à outra. Essa transferência é feita por meio dos pili sexuais presentes na célula doadora e requer que as células bacterianas estejam em contato muito próximo para ocorrer a troca. As células doadoras (células F<sup>+</sup>) contêm o fator de fertilidade (fator F), o qual é codificado pelo plasmídeo que carrega os genes que codificam a transferência por conjugação. O DNA plasmidial pode ser transmitido para células receptoras (F<sup>-</sup>). Quando o DNA plasmidial, contendo os genes responsáveis pelo fator F, é transmitido à célula receptora, esta se torna uma célula F<sup>+</sup> (doadora) (BARROS et al., 2013).

A resistência bacteriana ocorre devido à inúmeros mecanismos complexos e ainda não completamente entendidos. Genericamente, os mecanismos de resistência podem ser divididos em três grupos: inativação enzimática; alteração do sítio de ação do antimicrobiano e alteração do transporte do antimicrobiano (FIGURA 3).

FIGURA 3 – PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.



(BARROS et al., 2013)

A inibição ou inativação enzimática do antimicrobiano é o principal mecanismo de resistência adquirida contra antimicrobianos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems). Nesse caso, as bactérias podem produzir enzimas (beta-lactamases) que têm a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico e, conseqüentemente, inativar o agente antimicrobiano. Muitas dessas beta-lactamases são codificadas por genes plasmidiais, sendo, portanto, transmissíveis entre diferentes bactérias. A inativação enzimática é um mecanismo de resistência que afeta outros grupos de antimicrobianos como os aminoglicosídeos (inativados por acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases) e o cloranfenicol (inativado por acetiltransferases denominadas enzimas CAT) (BARROS et al., 2013).

A alteração do sítio de ação é a capacidade de alterar a molécula alvo da ação dos antimicrobianos. Assim, o sítio de ação em que o antimicrobiano atua pode ser alterado de maneira que essa estrutura passa a apresentar uma baixa afinidade pelo agente antibacteriano. Esse tipo de mecanismo é mais comum em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. De forma similar, a resistência à tetraciclina resulta, frequentemente, da produção de uma proteína que interage de tal maneira com o ribossomo, que fica “protegido” da ação do antimicrobiano. A resistência às quinolonas está, muitas vezes, associada a alterações (múltiplas mutações) no gene

*gyrA*, o que causa mudanças estruturais nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, estruturas-alvo da ação dos antimicrobianos do grupo das quinolonas (BARROS et al., 2013).

Na alteração do transporte, as bactérias podem tornar-se resistentes à ação dos antimicrobianos devido ao efluxo ativo que retira o antimicrobiano de dentro da célula ou através da alteração permeabilidade da parede bacteriana. Esses mecanismos são mais comuns em bactérias Gram-negativas do que em bactérias Gram-positivas. De modo geral, os antimicrobianos atravessam a membrana externa por meio de proteínas denominadas porinas. Assim, mutações causadoras de diminuição na produção de porinas ou mesmo alteração estrutural nessas proteínas levam à redução da permeabilidade celular. O mecanismo de diminuição de permeabilidade é o principal responsável pela resistência a baixos níveis de aminoglicosídeos que pode ocorrer em *E. coli*. Por outro lado, a habilidade de efluxo ativo é responsável pela resistência a macrolídeos, e tetraciclina (BARROS et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271–281, 2005.

ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D.; ESTEVE, C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3348–3350, 2005.

ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T. S. Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance - Potential for consumer health risks. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 139–155, 1998.

ALI, S. S. et al. Macroalgal activity against multiple drug resistant *Aeromonas hydrophila*: A novel treatment study towards enhancement of fish growth performance. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, n. December 2016, p. 89–95, 2016.

ALLEN, S. E. et al. Comparison of *Escherichia coli* recovery and antimicrobial resistance in cecal, colon, and fecal samples collected from wild house mice (*Mus musculus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 2, p. 432–436, 2013.

ANDERSON, A. D. et al. Public Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Food Animals in the United States. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 4, p. 373–379, 2003.

ANGULO, F. J. et al. Antimicrobial use in agriculture: Controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 78–85, 2004.

BARROS, Elvino et al. **Antimicrobianos: Consulta Rápida**. Artmed Editora, 2013.

BAILEY, J. K. et al. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: A reservoir for antibiotic-resistance determinants. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 1331–1339, 2010.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de

carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. **Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango (Prebaf)**, p. 188, 2012.

BUSINESS, R. Vietnamese Shrimp Aquaculture—Impacts and Improvement. In: **Environmental Justice Foundation**. London, UK, 2003.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.

CABELLO, F. C. et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1917–1942, 2013.

CHÁFER-PERICÁS, C. et al. Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9, p. 1–15, 2010.

CHOWDHURY, R. et al. A Review On Antibiotics In An Animal Feed. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1–2, p. 22–32, 2009.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 950–974, 2018.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634–643, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/ps/84.4.634>>.

EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the statistical analysis of temporal and spatial trends of zoonotic agents in animals and food. Part I: critical review of the statistical analysis carried out on the Community Summary Report 2006 data. **The EFSA Journal** 253, 1-77, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.253r>>.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. **Sustainability in action**. 2020 Disponível em: <<https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>>.

FERNANDEZ-TORRES, R. et al. Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 5, p. 1146–1156, 2011.

Ford Susan M. **Farmacologia clínica**. Tradução Patricia Lydie Voeux; revisão técnica Lenita Wannmacher. - 11. ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2019.

GAO, L. et al. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 86, n. 6, p. 665–671, 2012.

GARCIA, F. et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410–411, n. October 2013, p. 51–56, 2013.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 29–45, 2014.

GRAVE, K. et al. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 243–252, 1999.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. **Guia De Antimicrobianos Em Veterinária**, n. 1, p. 17–30, 2010.

GULLBERG, E. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. 1–9, 2011.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; TJØRNELUND, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 263–271, 2002.

HE, S. et al. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂)? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 785–791, 2012.

HESP, A. et al. Monitoring antimicrobial resistance trends in commensal *Escherichia coli* from livestock, the Netherlands, 1998 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 25, p. 1–22, 2019.

HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1248–1253, 2009.

HOSSAIN, A. et al. Occurrence, distribution, ecological and resistance risks of

antibiotics in surface water of finfish and shellfish aquaculture in Bangladesh. **Chemosphere**, v. 188, n. December 2017, p. 329–336, 2017.

KAESBOHRER, A. et al. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. SUPPL.2, p. 158–165, 2012.

KORSGAARD, H. B. et al. DANMAP 2019 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food, and humans in Denmark. **Danmap**, 2020. Disponível em: <[http://www.danmap.org/~media/Projektsites/Danmap/DANMAPreports/Danmap\\_2011.ashx](http://www.danmap.org/~media/Projektsites/Danmap/DANMAPreports/Danmap_2011.ashx)>.

L'ABÉE-LUND, T. M.; SØRUM, H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 263–272, 2001.

LABELLA, A. et al. High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 197–203, 2013.

LE, T. X.; MUNEKAGE, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 11–12, p. 922–929, 2004.

LE, T. X.; MUNEKAGE, Y.; KATO, S. I. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. **Science of the Total Environment**, v. 349, n. 1–3, p. 95–105, 2005.

LOZANO, I. et al. Antibiotics in Chilean aquaculture: a review. **Antibiotic use in animals**, p.25-44, 2018.

LULIJWA, R.; RUPIA, E. J.; ALFARO, A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 640–663, 2020.

MAQSOOD, S. et al. International Aquatic Research Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. **Int Aquat Res**, v. 3, p. 147–163, 2011.

MCCORMACK, E.; ROCHE, C.; NIXON, E. Assessment of Impacts of Mariculture Biodiversity Series. **The Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic (OSPAR Convention)**, p. 64, 2009. Disponível em:

<[http://qsr2010.ospar.org/media/assessments/p00442\\_Impacts\\_of\\_Mariculture.pdf](http://qsr2010.ospar.org/media/assessments/p00442_Impacts_of_Mariculture.pdf)>.

MCEWEN, S. A.; AARESTRUP, FRANK M. JORDAN, D. Monitoring of antimicrobial resistance in animals: principles and practices. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**, p. 397-413, 2005.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, v. 212, n. 1–4, p. 31–47, 2002.

MO, W. Y. et al. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 8978–8989, 2017.

NANDI, S. et al. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7118–7122, 2004.

NYS, S. et al. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 952–955, 2004.

PALLECCHI, L. et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1179–1184, 2007.

PARK, K.; KWAK, I. S. Disrupting effects of antibiotic sulfathiazole on developmental process during sensitive life-cycle stage of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 190, n. January 2018, p. 25–34, 2018.

PETERSEN, A. et al. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6036–6042, 2002.

PORMOHAMMAD, A.; NASIRI, M. J.; AZIMI, T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: A systematic review and meta-analysis. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1181–1197, 2019.

REDA, R. M. et al. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 4, p. 241–248, 2013.

RHODES, G. et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between

aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3883–3890, 2000.

RICO, A. et al. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: A critical review. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 75–93, 2012.

ROLAIN, J.-M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 173, 2013.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1215–1226, 2008.

SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **Food & Agriculture Org**, v. 469, 2005.

SHAMSUZZAMAN, M. M.; BISWAS, T. K. Aqua chemicals in shrimp farm: A study from south-west coast of Bangladesh. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 4, p. 275–285, 2012.

SOMMER, M. O. A.; DANTAS, G.; CHURCH, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1128–1131, 2009.

SONG, C. et al. Occurrence of antibiotics and their impacts to primary productivity in fishponds around Tai Lake, China. **Chemosphere**, v. 161, n. October 2016, p. 127–135, 2016.

SØRUM, H. Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. In: **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**, p. 213–238, 2005.

SOUZA, F. Peixe BR da Piscicultura. p. 1–140, 2021.

TADESSE, D. A. et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 741–749, 2012.

TROMSØ, O. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. **NORM/NORM-VET**, 2019.

VERMELHO, Alane Beatriz. **Práticas de microbiologia**. Guanabara Koogan, 2006.

WASYL, D. et al. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 221, 2013.

ZHANG, Q. et al. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: Association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 24, p. 14317–14325, 2014.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras da cadeia produtiva de Tilápias-do-Nilo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) dos isolados de *E. coli* obtidos.
- Verificar a multirresistência dos isolados de *E. coli* a drogas antimicrobianas.
- Avaliar a distribuição de resistência antimicrobiana de acordo com a origem das amostras analisadas.

#### **4 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

##### RESUMO:

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidos da cadeia de tilapicultura; a verificação de multirresistência a drogas antimicrobianas (MDR) e a avaliação da produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) através da técnica da sinergia de duplo disco (DDST). Um total de 584 isolados foram obtidos de amostras do ambiente de criação, abate e processamento de tilápias, de produtos finais e de fezes de trabalhadores do frigorífico na região oeste do Paraná, Brasil. Os isolados de *E. coli* foram recuperados de amostras fecais de humanos, amostras de água do tanque representativas da propriedade, amostras de água residuárias do ambiente de abate (*Chiller*, escamadeira e evisceração) e de produto final (filé de tilápia). Na avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, só foi possível recuperar 581 isolados, que foram testados frente a 10 antimicrobianos de 10 classes diferentes utilizando a técnica de disco difusão em ágar. Deste total 143 (24,6%) foram resistentes a amoxicilina (AML – 10µg); 110 (18,9%) à azitromicina (AZI 15µg); 49 (8,4%) à tetraciclina (TET - 30µg); 41 (7,1%) à ciprofloxacina (CIP - 5µg); 24 (4,1%) ao sulfametoxazol/trimetropim (SUT - 23,75-1,25 µg); 14 (2,4%) ao imipenem (IMP - 10µg); 12 (2,1%) ao aztreonam (ATM - 30µg) ; 11(1,9%) à gentamicina (GEN - 10µg); sete (1,2%) à ceftiofur (CEF - 30µg) e seis (1%) ao cloranfenicol (CLO 30µg). Mesmo tendo ocorrido uma baixa distribuição de resistência em relação aos antimicrobianos testados, 257 (44,2%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, demonstrando assim, que a resistência ocorreu de forma ampla no estudo. Em relação a característica MDR 35 (6%) isolados apresentaram essa característica distribuídos em todos os pontos de coleta, principalmente em amostras de carcaça (18) seguido de amostra de filé de Tilápia (5), água residuária do ambiente de abate (4) e amostras de água do tanque (3). Já em relação a análise de DDST, nove isolados (1,5%) foram produtores de ESBL, sendo que sete deles também foram MDR. Foi possível verificar nesse estudo uma distribuição ampla de resistência à amoxicilina e à azitromicina nos isolados testados. Já em amostras de fezes humanas os isolados apresentaram maior frequência de resistência, à tetraciclina seguido da resistência à ciprofloxacina, que também se mostrou frequente em amostras do ambiente de produção. Estes resultados demonstram que a cadeia de tilapicultura deve ser observada com atenção, para evitar que ela se torne uma potencial fonte de distribuição de elementos de resistência para os animais, ambiente e humanos.

Palavras-chave: Aquicultura; multidroga resistentes; ESBL; ambiente; humano; animal.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) considera que a piscicultura é a produção de proteína animal que mais vem crescendo nos últimos anos (FAO, 2020). O Brasil vem se consolidando nos últimos anos como um dos maiores produtores de Tilápia-do-Nilo do mundo e, segundo a Associação Brasileira de Piscicultura em 2020, o país foi considerado o 4º maior produtor mundial (SOUZA, 2021). Com a prática intensiva e semi-intensiva há uma alta densidade de animais e o risco de disseminação de micro-organismos causadores de doenças de importância econômica e sanitária vem tornando o sistema de produção cada vez mais dependente de insumos químicos, principalmente os antimicrobianos (GARCIA et al., 2013).

A principal forma de utilização de antimicrobianos na criação de Tilápia-do-Nilo é na forma profilática principalmente na fase de levinocultura e na forma terapêutica. Sendo os antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina os únicos permitidos na aquicultura no Brasil, e o florfenicol o único antimicrobiano indicado para criação de Tilápia-do-Nilo (REDA et al., 2013). Entretanto, essa prática pode aumentar a resistência bacteriana contra os antimicrobianos, levando ao aparecimento de bactérias cada vez mais difíceis de serem controladas com o uso desses agentes (CABELLO, 2006).

A maneira mais comum de administração de antimicrobianos na aquicultura é no uso desses medicamentos na ração para os peixes que, como consequência, acaba adicionando esses compostos diretamente na água. Essa prática resulta na utilização intensa de agentes antimicrobianos e transferência de grande quantidade para os animais e ambiente, podendo também os seres humanos entrar em contato com esses agentes.

Com o intuito de realizar uma abordagem em *One Health* analisando amostras do ambiente, dos animais e dos humanos na cadeia de Tilápia-do-Nilo e utilizando *E. coli* como modelo microbiano, tendo em vista que esse micro-organismo é comumente utilizado pela facilidade de troca de material genético, fácil isolamento e por estar presentes em humanos animais e ambiente, o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização fenotípica de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* obtidos da cadeia de tilapicultura, recuperados de amostras fecais de humanos, amostras do ambiente de aquicultura, bem como do produto final de Tilápia-do-Nilo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Amostragem

Para a amostragem, foi selecionado um abatedouro de Tilápia-do-Nilo regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal localizado no oeste do Paraná, com média diária de abate de 140.000 animais por dia. Neste estabelecimento e no período de outubro a dezembro de 2019, foram coletadas amostras da água do tanque de depuração de lotes de 10 propriedades distintas (sendo que não foi utilizado nenhum antimicrobiano durante o período de produção) e enviados ao abate, amostras da água do ambiente de abate, de carcaças, do produto final - filés de Tilápia e de fezes dos funcionários (TABELA 2).

TABELA 2 – NÚMERO DE AMOSTRAS, UNIDADE AMOSTRAL E PONTOS DE COLETA DE UM ABATEDOURO DE TILÁPIA-DO-NILO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.

<b>Amostras</b>	<b>Unidade</b>	<b>Número de amostras</b>
Água do tanque de depuração*	25 ml	10
Carcaça após sangria	Enxágue 100 ml	100
Água do <i>chiller</i>	25 ml	10
Água residuária descamação	25 ml	10
Água residuária da evisceração	25 ml	10
Filé de Tilápia	Enxágue 100 ml	100
Fezes dos funcionários	<i>Swab</i>	13
Total	-	253

\* Água do tanque era coletada após 4 horas de depuração e a amostra foi considerada representativa da propriedade.

As amostras coletadas foram estocadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA, do Departamento de Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, Brasil, para processamento.

Especificamente em relação as amostras de fezes dos humanos, eles foram escolhidos aleatoriamente entre funcionários dos setores de área suja (sangria e evisceração) e área limpa (filetagem). Todos os funcionários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, parecer 3.454.359 de acordo com o Comitê de Ética

em Pesquisa com seres humanos. Estas amostras foram coletadas pelo próprio indivíduo, identificadas e estocadas em caixas isotérmicas para encaminhamento ao laboratório.

#### 4.2.2 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

O isolamento de *E. coli* foi realizado seguindo as diretrizes do 4º Compêndio de Métodos para o exame microbiológico de Alimentos divulgado pela *American Public Health Association* (DOWNES e ITO, 2001), com algumas modificações. As amostras de fezes oriundas de humanos foram semeadas em Ágar MacConkey (Oxoid) e incubadas por aproximadamente 20 horas a 37°C. As amostras de água foram processadas adicionando um total de 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) (Oxoid), homogeneizadas em *Stomacher* por 2 minutos e incubadas a 37°C por 20h. As amostras de enxágue (carcaças e filé de Tilápia) foram homogeneizadas em *Stomacher* por 2 minutos e incubadas a 37°C por 20h. Após o período de incubação, uma alíquota de APT (Oxoid) foi transferida para o caldo *Escherichia coli* (EC) (Oxoid) e incubado a 44,5°C por 48h juntamente com controle positivo *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e controle negativo *Serratia* sp (cultura pertencente a bacterioteca do LACOMA). As amostras que apresentavam gás no tubo de Durham foram estriadas diretamente em Ágar MacConkey (Oxoid) e incubadas a 37°C por 20h. Caso estivessem presentes, um total de quatro colônias fermentadoras de lactose com morfologia típicas para *E. coli* e uma não fermentadora de lactose de cada tipo morfológico por amostra eram selecionadas para confirmação, porém nem sempre era possível isolar essa quantidade de colônias. Todas as colônias suspeitas selecionadas foram identificadas como *E. coli* através do cultivo nos testes bioquímicos do IMViC (Indol, vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato).

Os isolados que apresentaram perfis bioquímicos compatíveis com *E. coli* e lactose negativos foram submetidos à extração do DNA por método térmico, descrito por Dias, et al. (2016) com modificações. Para a extração do DNA, 500 µl das culturas cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid) foram transferidos para microtubos de 1.500 µl e centrifugados durante 10 minutos a 4.000 × g. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1.000 µl de Tampão Fosfato Salino (PBS) e homogeneizado em agitador tipo vortex. Os microtubos foram novamente centrifugados a 4.000 × g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 300 µl de água

destilada isenta de DNase-RNase (Sigma, Sigma-Aldrich s.r., Gallarate, Milão, Itália). Essa suspensão foi aquecida a 100 °C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugada a 10.000 × g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

O DNA extraído foi submetido a detecção do gene *uspA* para confirmação da espécie conforme descrito por Chen e Griffiths (1998). As reações de amplificação foram conduzidas com 10 µL do Gotaq Green Master Mix (Cellco Biote), 200 nMol de cada primer, 4 µL do DNA extraído e água livre de nuclease até completar o total de 20 µL. As condições utilizadas para amplificações da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento primário a 70 °C por 20s, extensão a 72 °C por 30s, e extensão final a 72 °C por 7 min (Chen e Griffiths, 1998). As sequências de *primers* e tamanhos dos produtos esperados estão especificados na TABELA 3. A cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ foi utilizada como controle positivo. Alíquotas de 10 µl dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta.

TABELA 3 - GENE PESQUISADO, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO E TAMANHO ESPERADO DO PRODUTO.

Gene alvo	Sequência do primer 5'- 3'	Tamanho do produto (pb)
<i>uspA</i>	FW: CCGATACGCTGCCAATCAGT RV: ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	844

#### 4.2.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos pela técnica do disco-difusão

O isolados de *E. coli* foram testados quanto à resistência a antimicrobianos de diferentes classes através do método do disco-difusão em ágar, denominado de método de Bauer-Kirby (Bauer et al., 1966) seguindo-se o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Foram testados 10 antimicrobianos pertencentes a 10 classes diferentes: aminoglicosídeos: gentamicina (GEN - 10µg); quinolonas: ciprofloxacina (CIP - 5µg); tetraciclina: tetraciclina (TET - 30µg); fenicóis: cloranfenicol (CLO - 30µg); cefalosporinas de terceira geração: ceftiofur (CEF - 30µg); inibidor da via do folato: trimetoprim-sulfametoxazole (SUT - 23,75-1,25µg);

carbapenem: imipinem (IMP - 10µg); penicilinas: amoxicilina (AML - 10µg); monobactams: azetreonan (ATM - 30µg); macrolídeos: azitromicina (AZI - 15µg). Todos os discos utilizados neste teste eram do Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico - CECON, São Paulo, SP, Brazil. Os isolados foram cultivados em caldo BHI (Oxoid) e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente os subcultivos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland em BHI (Oxoid), estriados em placa de ágar Mueller Hilton (MH) (Oxoid) e após foi realizado a aplicação dos discos. *Escherichia coli* ATCC® 25922™ foi utilizada como controle de qualidade pan-suscetível. Os resultados foram interpretados como resistentes, sensíveis ou intermediários de acordo com os padrões de susceptibilidade de enterobactérias. (CLSI, 2020).

Isolados de *E. coli* resistentes a mais de três classes de antimicrobianos foram definidos como multidroga resistentes (MDR) (ECDC; EFSA; EMA, 2017).

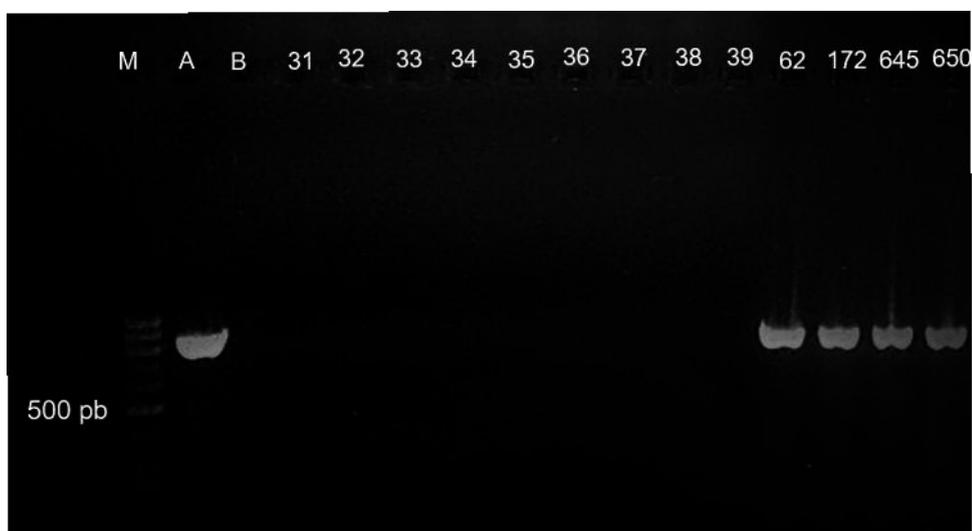
#### 4.2.4 Detecção de *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) pela técnica da sinergia de duplo disco (DDST)

Com o objetivo de detectar a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), foi realizada triagem dos isolados para detecção de ESBL utilizando-se dois antimicrobianos: ceftazidima (CAZ - 10µg) e cefotaxima (CTX - 10µg), cefalosporinas de terceira geração, para realização do teste DDST. Os isolados que apresentaram resultados com halos de inibição para ceftadizima e cefotaxima menores do que 22 e 21 mm, respectivamente, foram submetidos a uma caracterização fenotípica para produção de ESBL, de acordo com EUCAST (2013). Os isolados selecionados foram cultivados em caldo BHI (Oxoid) e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente os subcultivos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland em BHI (Oxoid) e estriados em placa de ágar MH (Oxoid). Após a secagem, um disco central contendo a combinação de amoxicilina com ácido clavulânico – (AMC - 20/10µg) e em um raio de 20 mm a partir do disco central, foram aplicados três discos, dois de cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima – CAZ – 30µg e cefotaxima – CTX – 30µg) e uma cefalosporina de quarta geração (cefepima – CPM – 30µg) (todos os discos da CECON). *Escherichia coli* ATCC® 25922™ foi utilizada como controle de qualidade pan-suscetível. Os isolados foram caracterizados como produtores de ESBL quando as zonas de inibição ao redor de qualquer um dos discos de cefalosporinas apresentaram crescimento confluyente na direção do disco contendo amoxicilina com ácido clavulânico (EUCAST, 2013).

### 4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Do total de 253 amostras em 248 foram obtidos resultados com crescimento de colônias em ágar McConkey (Oxoid), chegando-se a um total de 1.419 isolados. Após testes bioquímicos, 670 isolados apresentaram perfil bioquímico compatível com *E. coli*, 580 lactase positiva e 90 lactase negativa. Considerando a baixa ocorrência de *E. coli* lactose negativa, 5% (PROCOP et al., 2017), foi realizada a confirmação por PCR dos 90 isolados que apresentaram essa característica e somente 4 (4,4%) foram confirmados como *E. coli*, por amplificarem o gene *uspA* (FIGURA 3). No total foram confirmados 584 isolados como sendo de *E. coli* (TABELA 4).

FIGURA 4 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*



Eletroforese em gel de agarose de produto de PCR para identificação, através da detecção do gene *uspA* (844 pb). M: 100 bp DNA ladder; A: *E. Coli* ATCC® 25922™ ; B: branco; Isolados 31,32,33,34,35,36,37,38,39,62,172,645 e 650.

TABELA 4 – TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS, RESPECTIVOS RESULTADOS DE POSITIVIDADE E TOTAL DE CEPAS DE *E. coli* ISOLADAS DE ACORDO COM A ORIGEM COLETADAS EM UM ABATEDOURO DE TILÁPIA-DO-NILO NO OESTE DO PARANÁ.

Amostras	Total	Amostras positivas	Isolados de <i>E. coli</i>
Origem	Nº	Nº	Nº
Água do tanque de depuração	10	10	28
Carcaça após sangria	100	69	237
Água do <i>chiller</i>	10	10	32
Água residuária descamação	10	9	32
Água residuária evisceração	10	1	4
Filé de Tilápia	100	61	201
Fezes funcionário	13	13	50
Total	253	173	584

Todas as amostras do tanque de depuração foram positivas para presença de *E. coli*. Como não foi possível realizar a coleta de água no tanque da propriedade, a coleta desse ponto foi realizada após as 4 horas de depuração com o intuito de se ter uma noção da presença desse micro-organismo oriundo da propriedade. No ambiente aquático são encontrados diversos micro-organismos (BOUFLEUER, 2015), a água utilizada para produção de Tilápias-do-Nilo, na maioria das vezes, vem de rios e afluentes próximos às propriedades. Essa água geralmente não é tratada antes de entrar no tanque, levando com ela os micro-organismos. Diversos trabalhos realizaram a identificação dos micro-organismos presentes na água utilizada na criação de Tilápias-do-Nilo, sendo a família *Enterobacteriaceae* a mais encontrada (CONCEIÇÃO et al., 2012; BOUFLEUER, 2015), confirmando, o resultado obtido no tanque de depuração.

Em relação às amostras de água residuária do frigorífico, o resultado obtido foi praticamente o mesmo nas etapas do *chiller*, com a presença de *E. coli* em todas as amostras analisadas e na água residuária da descamação, em que nove das 10 amostras foram positivas para a presença de *E. coli*. Em contrapartida, nas amostras de água residuária da evisceração, somente em uma das 10 amostras analisadas foi possível isolar *E. coli*, sugerindo que nesta etapa devido a uma microbiota ampla e diversificada de origem das vísceras (SUGITA et al., 1991), houve uma competição e assim uma maior dificuldade no isolamento.

Nas amostras de carcaça foi possível isolar *E. coli* em 69 das 100 analisadas. No filé de Tilápia os resultados também foram semelhantes, sendo 61 amostras positivas das 100 analisadas. Já em relação às 13 amostras de fezes humanas foi possível isolar *E. coli* em todas elas, sendo esse resultado já esperado uma vez que esse micro-organismo está presente no trato gastrointestinal de humanos.

Em relação ao resultado de susceptibilidade aos antimicrobianos, das 10 amostras analisadas do ambiente de produção (água tanque) todas apresentaram isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado. Já em amostras do ambiente de produção (água residuária do *chiller*, escamadeira e evisceração) das 30 amostras 20 apresentaram isolados resistentes. Nas amostras de carcaça das 100 analisadas 59 apresentaram isolados resistentes, em amostras de filé de Tilápia das 100 somente 35 apresentaram isolados resistentes. Em relação as amostras de fezes humanas das 13 amostras, 12 apresentaram isolados resistentes. Os resultados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos estão demonstrados na TABELA 5. Foram utilizados 581 isolados para realização desse teste uma vez que, foram perdidos três isolados, que eram originários de amostras de filé de Tilápia.

TABELA 5 – NÚMERO TOTAL E PORCENTAGENS DE ISOLADOS RESISTENTES E INTERMEDIÁRIOS A 10 ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO, ISOLADOS MULTIDROGA RESISTENTES (MDR) E ISOLADOS PRODUTORES DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) POSITIVOS DE *E. coli* DE DIFERENTES ORIGENS DE AMOSTRAS COLETADAS EM UM ABATEDOURO DE TILÁPIAS-DO-NILO DO OESTE DO PARANÁ

Número de Isolados	ORIGEM DAS AMOSTRAS*											
	Ambiente de produção		Água residuária de ambiente de abate		Carcaça		Produto Final		Fezes humanas		Total	
	28		68		237		196		50		581	
Antimicrobianos**	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)
AML	9 (32,1)	5 (17,9)	16 (23,5)	17 (25)	65 (27)	48 (20,2)	36 (18,2)	33 (16,8)	17 (34)	5 (10)	143 (24,6)	108 (18,6)
CEF	0 (0)	2 (7,1)	1 (1,5)	6 (8,8)	2 (0,8)	33 (13,9)	3 (1,5)	15 (7,6)	1 (2)	3 (6)	7 (1,2)	59 (10,2)
CIP	4 (14,2)	11 (39,3)	4 (5,9)	15 (22)	19 (8)	127 (53,6)	6 (3)	61 (31,1)	8 (16)	24 (48)	41 (7,1)	248 (42,7)
CLO	1 (3,6)	1 (3,6)	1 (1,5)	0 (0)	4 (1,7)	2 (0,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (0,9)	3 (0,5)
SUT	1 (3,6)	0 (0)	6 (8,8)	3 (4,4)	10 (4,2)	1 (0,4)	4 (2)	0 (0)	3 (6)	0 (0)	24 (4,1)	4 (0,3)
TET	2 (7,1)	0 (0)	6 (8,8)	1 (1,5)	18 (7,6)	2 (0,8)	14 (7)	0 (0)	9 (18)	0 (0)	49 (8,4)	3 (0,5)
IMP	0 (0)	0 (0)	1 (1,5)	12 (17,6)	8 (3,4)	50 (21,1)	3 (1,5)	11 (5,6)	2 (4)	12 (24)	14 (2,4)	85 (14,6)
ATM	1 (3,6)	0 (0)	3 (4,4)	5 (7,3)	2 (0,8)	6 (2,5)	5 (2,5)	6 (3)	1 (2)	1 (2)	12 (2,1)	18 (3,1)
GEN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,5)	5 (2,1)	11 (4,6)	4 (2)	14 (7)	2 (4)	0 (0)	11 (1,9)	26 (4,5)
AZI	5 (17,9)	-	9 (13,2)	-	58 (24,5)	-	22 (11,1)	-	16 (32)	-	110 (18,9)	-
Avaliação	Resultado (%)											
MDR	3 (10,7)		4 (5,9)		18 (7,6)		6 (3)		4 (8)		35 (6)	
ESBL	0 (0)		2 (2,9)		4 (1,7)		1 (0,5)		2 (4)		9 (1,5)	

\* Ambiente de produção: amostras de água do tanque; Água residuária de ambiente de abate: amostras de água do *chiller*; água da escamadeira e água da evisceração. ° Amostras de filé de Tilápia. \*\* R: resistente, I: intermediário. AML, Amoxicilina (10µg); CEF, Ceftiofur (30µg); CIP, Ciprofloxacina (5µg); CLO, Cloranfenicol (30µg); SUT, Sulfametazole/Trimetropim (23,75-1,25µg); TET, Tetraciclina (30µg); IMP (10µg), Imipenem; ATM, Aztreonam (30µg); GEN, Gentamicina (10µg); AZI, Azitromicina (15µg).

A resistência à amoxicilina (24,6%) e à azitromicina (18,9%) ocorreu com maior frequência e de forma ampla neste estudo. A resistência das bactérias Gram-negativas à azitromicina já era esperada devido à resistência intrínseca desses micro-organismos aos macrólídeos (BARROS et al., 2013). Além disso, a resistência encontrada à amoxicilina não é surpreendente, pois dados da literatura indicam uma variação entre 15 e 80% de resistência em bactérias Gram-negativas, em estudos realizados em vários países (HO et al., 2000; SCHMIDT et al., 2000; MIRAND e ZEMELMAN 2002; SAHA e PAL 2002; CHELOSSI et al. 2003; HATHA et al., 2005). A resistência à amoxicilina pelas bactérias no ambiente aquático pode ser explicada pela transferência horizontal de fatores de resistência entre cepas resistentes e cepas sensíveis (ARVANITIDOU et al., 1997; MCMANUS, 1997).

A segunda maior resistência ocorreu com a tetraciclina, em 8,4% do total de isolados e se deu de forma semelhante em isolados de amostras de carcaça (3,1%) e filé (2,4%), seguido de isolados de amostras de fezes (1,6%). Este antimicrobiano é utilizado principalmente na forma profilática (SØRUM et al. 1992; MIRANDA et al. 2003) e no Brasil é permitido o uso da oxitetraciclina, antimicrobiano da mesma classe, na piscicultura. Tendo em vista que na maior parte da cadeia das indústrias de piscicultura, o antimicrobiano mais utilizado dessa classe é a oxitetraciclina, a disseminação de genes relacionados à tetraciclinas podem ainda estar circulantes.

A resistência à tetraciclinas e/ou oxitetraciclina tem sido comumente relatadas (PARK et al.1994; SON et al. 1997; HO et al. 2000; RHODES et al. 2000; SCHMIDT et al. 2000; KIM et al. 2004; HATHA et al. 2005). Em um trabalho realizado por Tuševljak et al. e (2013), foi feito um estudo global sobre o uso e resistência à antimicrobianos na aquicultura por meio de um questionário. Nesse estudo, percebeu-se que o antimicrobiano mais utilizado foi a tetraciclina, sendo relatada por 18% dos entrevistados, já a resistência à tetraciclina, em uma ou mais espécies de bactérias, foi relatada frequente por 17% dos entrevistados na criação de Tilápia-do-Nilo (TUŠEVLJAK et al., 2013).

Levando em consideração que não foi utilizado nenhum antimicrobiano durante o período de realização do presente estudo, a baixa frequência de isolados resistentes está condizente. Porém, mesmo que essa percepção tenha sido constatada, ainda sim foi possível isolar micro-organismos resistentes a tetraciclina. Esse resultado pode estar relacionado com a presença de *E. coli* resistentes a

tetraciclinas provenientes das amostras ambientais de rios, como no estudo realizado por Tao et al. (2010), no qual 19% foram resistentes à elas.

A resistência à ciprofloxacina foi a terceira maior, em 7,1% dos isolados. Em isolados de amostras ambientais é possível observar uma baixa frequência de resistência à quinolona (MCKEON et al., 1995; GUARDABASSI et al., 1998). Dessa forma, ainda que tenha sido possível verificar uma baixa ocorrência no presente estudo, esse dado pode indicar que as amostras de tanque, que nesse estudo foram consideradas amostras representativas da produção, podem estar propagando a resistência ao longo da cadeia de abate, já que em amostras do filé de Tilápia (1%) foram encontrados isolados resistentes a esse antimicrobiano. Porém só seria possível realmente afirmar a propagação ao longo do abate, realizando testes de similaridade como o PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), ou sequenciamento do genoma completo. Em outros trabalhos de aquicultura não foi observada resistência a esse antimicrobiano (AKINBOWALE et al., 2006; ROCHA et al., 2014).

Sulfametazole/trimetropim apresentou resistência à 4,1% dos isolados. Esse baixo índice de isolados resistentes também pode ser observado em outros trabalhos realizados com Tilápia-do-Nilo (LIMA et al., 2005; ROCHA et al., 2014). De acordo com Lamshöft et al. (2007), as sulfonamidas são altamente solúveis em água e persistentes no meio ambiente. Assim, os resíduos podem ser detectados em até 10 dias após a administração, sugerindo a possibilidade de detecção de bactérias resistentes à sulfmetazole/trimetropim por um período relativamente longo. No presente estudo, o local com a maior frequência de isolados resistentes à este antimicrobiano foi a carcaça. Tendo em vista que a utilização desse antimicrobiano não é permitida no Brasil, esse resultado sugere a transferência de resistência de micro-organismos ambientais para os animais.

A resistência ao Imipenem (2,4%) e azetreonam (2,1%) foram baixas. Em um estudo realizado por Rocha et al. (2014) com Tilápia-do-Nilo no Brasil, não foi encontrado nenhum isolado resistente ao azetreonam. Os percentuais semelhantes encontrados para estes dois antimicrobianos podem ter sua explicação em virtude de ser mecanismos de ação serem iguais, ou seja, agindo principalmente na parede celular dos micro-organismo (BARROS et al., 2013).

Em relação a gentamicina, 1,9% apresentaram-se resistentes, tendo sido considerado também um baixo percentual de resistência, assim como verificado para o imipenem (2,4%), azetreonan (2,1%), ceftiofur (1,2%) e cloranfenicol (0,9%). Alguns

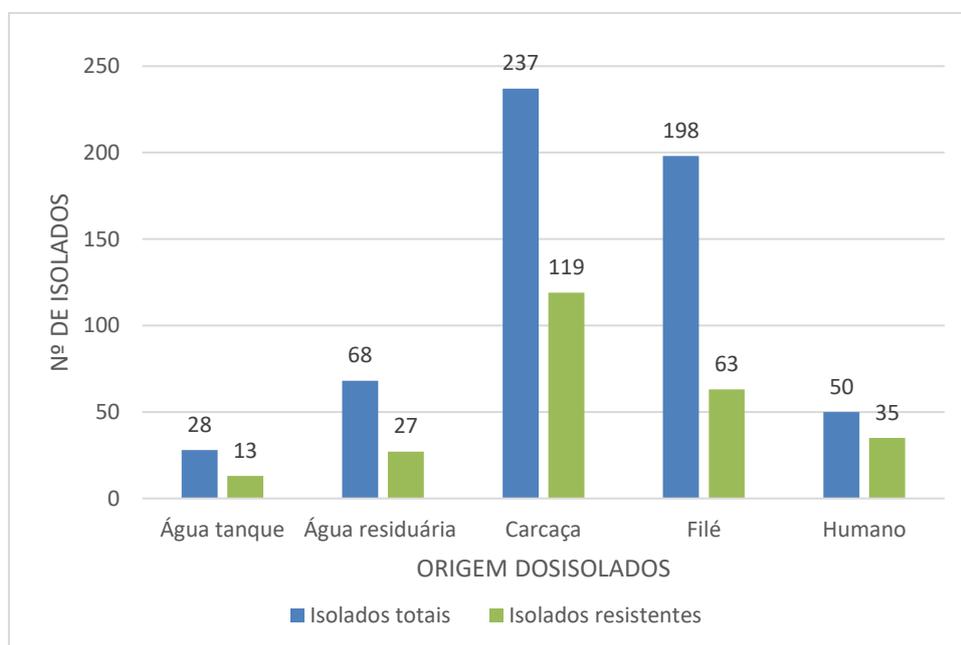
estudos realizados no Brasil demonstraram que a frequência de resistência a gentamicina de isolados na criação de Tilápia-do-Nilo variou de 0 a 15% (BOUFLEUER, 2015; ROCHA et al., 2014; CARNEIRO et al., 2007), mesmo sendo considerada uma alta variação, o resultado desse estudo se encontra dentro dessa faixa.

A resistência a cefalosporinas de terceira geração, considerada “criticamente importantes” segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019) com base na sua importância para a saúde pública, no presente estudo a resistência a este antimicrobiano também foi considerada baixa, ceftiofur apresentou 1,2% de isolados resistentes, semelhante a estudos no Sudeste Asiático, onde menos de 10% de isolados resistentes foram relatados (NHUNG et al., 2016).

Já em relação aos resultados ao cloranfenicol, 0,9% dos isolados foram resistentes, sendo esse resultado extremamente baixo, tendo em vista que na criação de Tilápia-do-Nilo no Brasil o florfenicol, que pertence a mesma classe de antimicrobianos, é o único agente permitido como uso terapêutico. O baixo resultado de isolados resistentes está condizente com o fato, já exposto anteriormente, de que não foi administrado nenhum antibiótico durante o período de criação dos peixes. Em outro estudo brasileiro, a frequência variou de 22 a 30% (CARNEIRO et al., 2007). Esse alto nível de resistência pode estar relacionado a utilização na forma terapêutica durante a criação. A resistência ao cloranfenicol em amostras de aquicultura também foi observada no Chile (MIRANDA e ZEMELMAN 2002), França (MICHEL et al., 2003) e em um estudo do Mediterrâneo Ocidental (CHELOSSI et al., 2003).

Dos 581 isolados testados 257 (44,2%) foram resistentes a pelo menos 1 antimicrobiano. Em relação ao número de isolados resistentes por origem de amostra, foi possível observar que proporcionalmente ao número total de isolados encontrados, nas amostras de fezes humana 70% dos isolados eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, seguido das amostras de carcaça com 50,2%, amostras de água tanque com 46,4%, amostras de água residuária de abate (*chiller*, escamadeira, evisceração) com 39,7%, e amostras de produto final (filé de Tilápia) com 31,8% (FIGURA 5).

FIGURA 5 – RELAÇÃO DE ISOLADOS TOTAIS E ISOLADOS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS POR ORIGEM DA AMOSTRA QUE FORAM OBTIDOS EM UM ABATEDOURO DE TILAPIAS-DO-NILO NO OESTE DO PARANÁ.



Água do tanque: propriedade; Água residuária: *chiller*, escamadeira e evisceração.

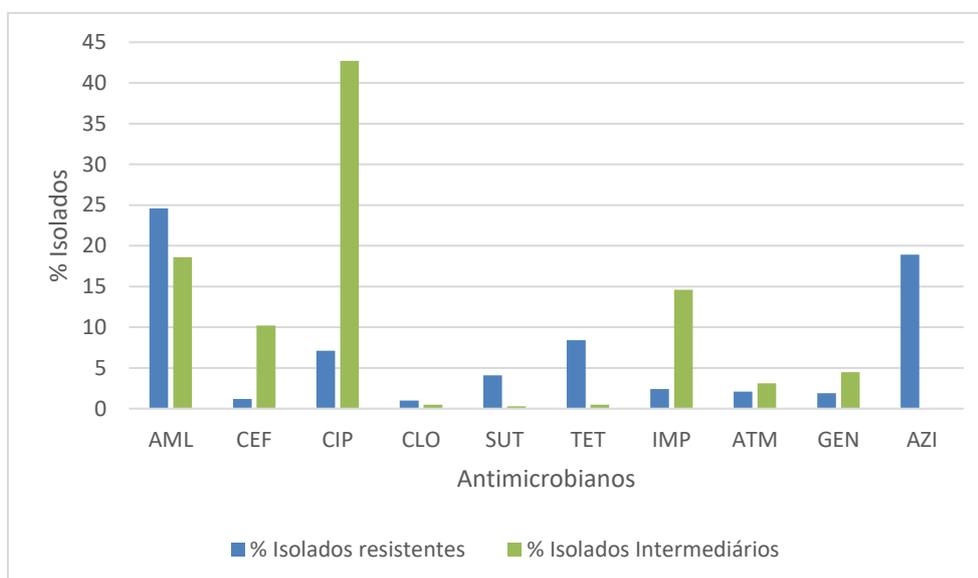
A disseminação de antimicrobianos na aquicultura pode representar uma ameaça à saúde humana, assim como contaminar o meio ambiente com resíduos desses agentes e organismos resistentes. Muitas das classes de antimicrobianos usados na aquicultura são idênticas às aquelas usadas para tratar animais terrestres e pacientes humanos (RICO et al., 2013; DONE et al., 2015; LULIJWA et al., 2020). Contudo, os sistemas de aquicultura são altamente complexos e muitas vezes integrados a outros sistemas de produção de alimentos (CANTAS et al., 2013; CHUAH et al., 2016; WATTS et al., 2017; SHEN et al., 2019), como, por exemplo, por meio do compartilhamento de fontes de água comuns, tornando-os altamente vulneráveis à introdução e disseminação ampla de agentes antimicrobianos (CABELLO et al., 2016; BRUNTON et al., 2019).

Com o intuito de explorar a resistência antimicrobiana de acordo com a fonte das amostras analisadas, de acordo com a TABELA 5, é possível observar que a distribuição da resistência em relação a amoxicilina ocorreu com maior frequência em amostras do ambiente de produção (32,1%) e em fezes humanas (34%). Já em relação ao ceftiofur foi observado que no ambiente de produção não foi possível isolar nenhuma cepa resistente a esse antimicrobiano. Em relação ao imipenem a maior

frequência de isolados foi observada em amostras de fezes humana (4%), não sendo constatado nenhum isolado resistente em amostras do ambiente de produção. Já em relação ao azetreonam foi possível observar maior frequência de isolados resistentes em amostras do ambiente de produção (3,6%) e em águas residuárias do ambiente de abate (4,4%). A resistência à gentamicina não foi observada em amostras de ambiente de produção e em água residuária de ambiente de abate. A resistência à tetraciclina foi observada com maior frequência em amostras de humanos (18%). Foi possível observar uma relação da resistência à ciprofloxacina em isolados de ambiente de produção que apresentou 14,2%, semelhante a amostras de fezes humanas, que apresentou 16% de resistência a este antimicrobiano. Sulfametazole/trimetropim apresentou menos de 10% de resistência ao longo de toda cadeia, sendo que em amostras de água residuária de ambiente de abate foi possível observar 8,8% de resistência. Em amostras de produto final e fezes humanas não foi encontrado nenhum isolado resistente ao cloranfenicol. Em relação à azitromicina e resistência ocorreu de forma semelhante em todos os tipos de amostra o que já era esperado, visto que *E. coli* apresenta resistência intrínseca a este antimicrobiano.

Estudos de vigilância são uma das principais ferramentas para lidar com o problema da resistência antimicrobiana, pois permitem o monitoramento dos padrões de resistência e permitem a detecção precoce de quaisquer tendências potenciais de resistência. Tão preocupante quanto a resistência de micro-organismos a determinado antimicrobiano, a observação de uma possível tendência para uma perda progressiva de atividade deve ser levada em conta. Na TABELA 5 é possível observar o número de isolados resistentes e o número de isolados intermediários a antimicrobianos por amostra e na figura 6 é possível observar a porcentagem do número total de isolados resistentes, comparado com a porcentagem de isolados com suscetibilidade intermediária para os antimicrobianos testados.

FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ISOLADOS RESISTENTES E COM SUCEPTIBILIDADE INTERMEDIÁRIA OBTIDOS EM UM ABATEDOURO DE TILAPIAS-DO-NILO NO OESTE DO PARANÁ.



AML, Amoxicilina (10µg); CEF, Ceftiofur (30µg); CIP, Ciprofloxacina (5µg); CLO, Cloranfenicol (30µg); SUT, Sulfametazole/Trimetropim (23,75-1,25µg); TET, Tetraciclina (30µg); IMP (10µg), Imipenem; ATM, Azetreonam (30µg); GEN, Gentamicina (10µg); AZI, Azitromicina (15µg).

O resultado observado para certos antimicrobianos é alarmante, principalmente para os antimicrobianos ciprofloxacina 42,7% (248); imipenem com 14,6% (85); ceftiofur 10,2% (59); gentamicina 4,5% (26) e azetreonam 3,1% (18) que apresentaram isolados com suscetibilidade intermediária superior ao número de isolados resistentes. Na literatura é possível encontrar estudos demonstrando uma tendência de isolados que eram considerados intermediários, se tornando resistentes (MASTERTON, 2002; TADESSE et al., 2012). Em um estudo retrospectivo realizado por Rhomberg e Jones (2009), é possível observar que isolados de *E. coli* ao longo dos anos foram aumentando a porcentagem de resistência a ciprofloxacina, inclusive para outros antimicrobianos como a gentamicina e imipenem. Constatando assim, que estudos de vigilância são essenciais para o controle de resistência.

Em relação a presença de isolados multidrogas resistentes (MDR) que são isolados resistentes a três classes de antimicrobianos ou mais (ECDC; EFSA; EMA, 2017), no presente estudo, 35 (6%) isolados apresentaram essa característica. Na TABELA 5 é possível observar os isolados por origem de amostra e na TABELA 6 é possível observar os perfis de MDR encontrados nesse estudo.

TABELA 6 – PERFIL DE RESISTENCIA DE 35 ISOLADOS DE *E. coli* MULTIDROGA RESISTENTES E A ORIGEM DA AMOSTRA ANALISADA

MDR	Antimicrobianos*	Nº de isolados	Origem
7	AML-CEF-IMP-ATM-TET-SUT-AZI	1	Filé de Tilápia
6	AML-CEF-IMP-TET-SUT-AZI	1	Filé de Tilápia
5	AML-TET-CIP-SUT-CLO	3	Carcaça
5	AML-CEF-TET-SUT-AZI	1	Água escamadeira
4	AML-TET-CIP-SUT	1	Água tanque
4	AML-TET-SUT-AZI	1	Filé de Tilápia
4	IMP-ATM-GEN-CIP	1	Filé de Tilápia
4	AMO-TET-CIP-CLO	1	Água tanque
4	AMO-CEF-TET-AZI	1	Carcaça
4	AMO-TET-SUT-AZI	2	Filé de Tilápia - Carcaça
4	AMO-ATM-TET-SUT	1	Água <i>chiller</i>
4	AMO-TET-SUT-CLO	1	Água <i>chiller</i>
4	AMO-CEF-TET-AZI	2	Humano - Carcaça
3	AMO-CIP-AZI	2	Água <i>chiller</i> - Água tanque
3	AMO-SUT-AZI	1	Carcaça
3	AMO-TET-SUT	1	Carcaça
3	AMO-TET-AZI	2	Carcaça – Filé de Tilápia
3	AMO-ATM-TET	1	Humano
3	AMO-TET-SUT	1	Humano
3	AMO-IMP-AZI	4	Carcaça - Humano
3	AMO-ATM-AZI	1	Carcaça
3	CIP-SUT-AZI	1	Carcaça
3	GEN-SUT-AZI	2	Carcaça
3	IMP-CIP-AZI	2	Carcaça

\* AML, Amoxicilina (10µg); CEF, Ceftiofur (30µg); CIP, Ciprofloxacina (5µg); CLO, Cloranfenicol (30µg); SUT, Sulfametazole/Trimetopim (23,75-1,25µg); TET, Tetraciclina (30µg); IMP (10µg), Imipenem; ATM, Azetreonam (30µg); GEN, Gentamicina (10µg); AZI, Azitromicina (15µg).

Existem duas maneiras pelas quais as bactérias distribuem os genes de resistência através de plasmídeos, a primeira é distribuindo genes individuais para vários plasmídeos diferentes e a segunda é agrupando vários genes na mesma unidade de transferência, chamado de plasmídeo MDR. Esses plasmídeos MDR são frequentemente resultado da recombinação interplasmídica, integração de transposons e/ou inserção de cassetes de genes de resistência (SCHWARZ et al., 2006). A vantagem seletiva proporcionada pela associação física de múltiplos genes de resistência quando os antimicrobianos são administrados em combinações pode explicar a tendência mundial crescente de MDR em cepas de *E. coli* de animais e humanos (SZMOLKA e NAGY, 2013).

A resistência a múltiplos medicamentos foi relatada em vários estudos de patógenos de peixes e ambientes de aquicultura (MCPHEARSON et al. 1991; SCHMIDT et al. 2000; HATHA et al. 2005). *E. coli* isolada de amostras comerciais de peixes e frutos do mar adquiridos nos mercados de atacado e varejo na Coreia demonstraram resistência múltipla a antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol, cefalotina, gentamicina e tetraciclina (RYU et al., 2012). Miranda e Zemelman (2002) também relataram que bactérias resistentes de seis a dez antibacterianos é usual.

O que mais chama atenção nos resultados em relação à MDR, é que foi possível encontrar isolados MDR em todos os tipos de amostras analisadas, sendo os isolados de produto final (filé de Tilápia) os que apresentaram o perfil de resistência ao maior número de classes de antimicrobianos. Uma amostra de filé de Tilápia apresentou resistência a 7 antimicrobianos (amoxicilina; ceftiofur; imipenem; azetreonam; tetraciclina; sulfametazole/trimetropim; azitromicina) e outra amostra também de filé de Tilápia apresentou resistência a 6 antimicrobianos (amoxicilina; ceftiofur; imipenem; tetraciclina; sulfametazole/trimetropim; azitromicina) conforme pode ser observado na TABELA 6, ficando evidente a distribuição de isolados MDR dentro do fluxo de abate.

Nas amostras de fezes humanas quatro isolados apresentaram ser MDR conforme a TABELA 6. Trabalhadores agrícolas nas áreas de produção animal representam um grupo importante, pois são mais propensos à contaminação por *E. coli* MDR de origem animal, se tornando portadores (VAN DEN BOGAARD et al., 2001), enquanto alimentos crus também podem ser uma fonte frequente de contaminação humana (MUSGROVE et al., 2006; ZHAO et al., 2012; MARTINS DA COSTA et al., 2013).

No teste de sinergia de duplo disco (DDST), 285 isolados foram selecionados na triagem para verificação da produção de ESBL. Após análise somente nove (1,5%) isolados foram capazes de produzir a enzima (TABELA 5). Comparativamente estudos realizados na China e Egito apresentaram resultados semelhantes, 1,5% e 4%, respectivamente (JIANG et al., 2012; ISHIDA et al., 2010).

As fontes desses isolados foram: água residuária da descamação (1); água residuária da evisceração (1); carcaça (4); filé de Tilápia (1) e fezes humana (2), sendo que dos nove isolados produtores de ESBL, sete deles também eram MDR. Plasmídeos MDR codificam resistência as principais classes antimicrobianas, incluindo aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, fenicóis, quinolonas, tetraciclinas e

sulfonamidas (CARATTOLI, 2013). Devido à sua extrema flexibilidade na aquisição e transmissão da grande maioria dos genes de resistência, os plasmídeos podem funcionar como reservatórios de outros genes de resistência, como CTX-M que tem a função de produzir ESBL e assim existir uma correção entre isolados MDR e isolados produtores de ESBL (SZMOLKA e NAGY, 2013).

O uso veterinário de  $\beta$ -lactâmicos de espectro estendido (cefalosporinas de terceira e quarta geração) nas últimas duas décadas, resultou no surgimento de plasmídeos portadores de ESBL em cepas de *E. coli* de origem animal (AARESTRUP, 2006). No entanto, bactérias produtoras de ESBL são relatadas de forma indiscutível em casos clínicos humanos (JACOBY e MUNOZ-PRICE, 2005). Li et al. (2007) forneceram um relatório cronológico sobre *E. coli* comensal produtor de ESBL de animais para alimentação entre 1992 e 2005. Os dados sugeriram uma distribuição mundial de vários tipos ESBL em cepas comensais de *E. coli*, de aves, suínos e bovinos, entre outras.

## 5 CONCLUSÃO

Os índices de resistência encontrados nesse estudo, assim como os altos percentuais de isolados, com respostas intermediárias à resistência, aos antimicrobianos, especialmente para ciprofloxacina, devem ser observados com atenção, para evitar que a cadeia de tilapicultura se torne uma potencial fonte de distribuição de elementos de resistência antimicrobiana para o ambiente, animais e humanos.

Avaliando a frequência de resistência por origem de amostra foi possível verificar uma distribuição ampla de resistência à amoxicilina e à azitromicina nos isolados testados. Já em fezes humanas a resistência à tetraciclina foi mais frequente seguido da resistência à ciprofloxacina, que também se mostrou frequente em amostras do ambiente de produção. Além disso, também foi possível observar uma baixa frequência de isolados MDR e produtores de ESBL.

A ampla distribuição de resistência, incluindo em fezes humanas, é uma grande preocupação em relação a saúde única, visto que as principais consequências da resistência aos antimicrobianos são o aumento da mortalidade por doenças que, anteriormente, eram tratáveis com antibióticos ou antimicrobianos quimioterápicos.

## REFERÊNCIAS

- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p. 1103–1113, 2006.
- ARVANITIDOU, M. et al. Transferable antibiotic resistance among Salmonella strains isolated from surface waters. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1112–1116, 1997.
- DIAS, R. C. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, p. 299–308, 2016.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BOUFLEUER, E. M. S. Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem. Unioest, Toledo, 2015.
- BRUNTON, L. A. et al. Identifying hotspots for antibiotic resistance emergence and selection, and elucidating pathways to human exposure: Application of a systems-thinking approach to aquaculture systems. **Science of the Total Environment**, v. 687, n. October 2019, p. 1344–1356, 2019.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.
- CABELLO, F. C. et al. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. e127–e133, 2016.
- CANTAS, L. et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. MAY, p. 1–2, 2013.
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>>.
- CARNEIRO, D. O. et al. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 869–876, 2007.
- CHELOSSI, E. et al. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. **Aquaculture**, v. 219, n. 1–4, p. 83–97, 2003.

CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 369–371, 1998.

CHUAH, L. O. et al. Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global Catfish Aquaculture. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 118–127, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S27, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CONCEIÇÃO, N. et al. Variação espacial e sazonal de microrganismos associados ao cultivo do Zungaro jahu (Ihering, 1898), na Estação Ambiental de Volta Grande no Estado de Minas Gerais. **J. Health Sci. Inst.**, v. 30, p. 186–190, 2012.

DIAS, R. C. B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, p. 299–308, 2016.

DONE, H. Y.; HALDEN, R. U. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 10–17, 2015.

DOWNES, F. .; ITO, K. American Public Health Association (APHA). In: **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4<sup>o</sup> ed. 2001.

ECDC; EFSA; EMA. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. European Centre for Disease Prevention and Control. European Food Safety Authority. European Medicines Agency. **The EFSA Journal**, p. 4872. 2017.

EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the statistical analysis of temporal and spatial trends of zoonotic agents in animals and food. Part I: critical review of the statistical analysis carried out on the Community Summary Report 2006 data. **The EFSA Journal** 253, 1-77, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.253r>>.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical

and/or epidemiological importance, version 1.0 Sweden, 2013.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.** 2020.

GARCIA, F. et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410–411, n. October 2013, p. 51–56, 2013.

GUARDABASSI, L. et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3499–3502, 1998.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A. A.; JOICE, G. J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 131–134, 2005.

HO, S. P. et al. Antibacterial Effect of Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol against Aquatic Animal Bacteria. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 5, p. 479–485, 2000.

ISHIDA, Y. et al. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Fish Farms in Egypt. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2010.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The New  $\beta$ -Lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380–391, 2005.

JIANG, H. X. et al. Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2350–2353, 2012.

KIM, S. R.; NONAKA, L.; SUZUKI, S. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 1, p. 147–156, 2004.

L'ABÉE-LUND, T. M.; SØRUM, H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 263–272, 2001.

LAMSHÖFT, M. et al. Metabolism of <sup>14</sup>C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 8, p. 1733–1745, 2007.

LI, X. Z. et al.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3–4, p. 197–214, 2007.

LIMA, R. M. S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 126–132, 2006.

LULIJWA, R.; RUIA, E. J.; ALFARO, A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 640–663, 2020.

MARTINS DA COSTA, P.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment. **OPEN ACCESS Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 10, 2013. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/ijerph](http://www.mdpi.com/journal/ijerph)>.

MASTERTON, R. G. Ciprofloxacin resistance - “Early-warning” signs from the MYSTIC surveillance programme? [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 218–220, 2002.

MCEWEN, S. A.; AARESTRUP, FRANK M. JORDAN, D. Monitoring of antimicrobial resistance in animals: principles and practices. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**, p. 397-413, 2005.

MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P.; BISSONNETTE, G. K. Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **Water Research**, v. 29, n. 8, p. 1902–1908, 1995.

MCMANUS, M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 54, n. 12, p. 1420–1433, 1997.

MCPHEARSON, R. M. et al. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 99, n. 3–4, p. 203–211, 1991.

MICHEL, C.; KEROUVAULT, B.; MARTIN, C. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 1008–1015, 2003.

MIRANDA, C. D. et al. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 883–888, 2003.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **Science of the Total Environment**, v. 293, n. 1–3, p. 207–218, 2002.

MUSGROVE, M. T. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1665–1669, 2006.

PARK, E. D.; LIGHTNER, D. V.; PARK, D. L. Antimicrobials in shrimp aquaculture in the United States: regulatory status and safety concerns. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 138, p. 1–20, 1994.

PROCOP, Gary W. et al. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Jones & Bartlett Publishers, 2020.

RHODES, G. et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3883–3890, 2000.

RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 4, p. 414–426, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.020>>.

RICO, A. et al. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**, v. 412–413, n. November 2013, p. 231–243, 2013.

ROCHA, R. dos S. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Fresh-Marketed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Pathogens**, v. 2014, n. c, p. 1–5, 2014.

RYU, S. H. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1–2, p. 14–18, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003>>.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 311–316, 2002.

SCHMIDT, A. S. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4908–4915, 2000.

SCHWARZ, S.; CLOECKAERT, A.; ROBERTS, M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. [s.l.: s.n.]

SHEN, Y. et al. Integrated aquaculture contributes to the transfer of mcr-1 between animals and humans via the aquaculture supply chain. **Environment International**, v. 130, n. September 2019, p. 1–25, 2019.

SON, R. et al. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 479–482, 1997.

SØRUM, H. Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. In: **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**, p. 213–238, 2005.

SØRUM, H.; ROBERTS, M. C.; CROSA, J. H. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 3, p. 611–615, 1992.

SOUZA, F.; DIAS, I. Peixe BR da Piscicultura. p. 1–140, 2021.

SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture**, v. 92, n. C, p. 267–276, 1991.

SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers in Microbiology**, 2013. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>.

TADESSE, D. A. et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 741–749, 2012.

TAO, R. et al. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 6, p. 2101–2109, 2010.

TUŠEVLJAK, N. et al. Antimicrobial use and resistance in aquaculture: Findings of a globally administered survey of aquaculture-allied professionals. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 6, p. 426–436, 2013.

VAN DEN BOGAARD, A. E. et al. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 763–771, 2001.

WATTS, J. E. M. et al. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. **marine drugs**, v. 15, p. 158, 2017. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/marinedrugs](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs)>.

**World Health Organization (WHO) 6th revision List of Critically Important Antimicrobials.** , 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/antimicrobial-resistance/cia/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia/en/)>.

ZHANG, Q. et al. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: Association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 24, p. 14317–14325, 2014.

ZHAO, S. et al. Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1701–1707, 2012.