

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**Investigação de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos
em pescado originário da aquicultura e comercializado no mercado
municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil**

Fernanda Freitas Dominguez

Orientador: Dr. Marcelo Barbosa Henriques

coorientador: Dr. Fábio Parra Sellera

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Aquicultura e Pesca
do Instituto de Pesca - APTA - SAA,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Aquicultura e
Pesca.

São Paulo
Fevereiro- 2024

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**Investigação de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos
em pescado originário da aquicultura e comercializado no mercado
municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil**

Fernanda Freitas Dominguez

Orientador: Dr. Marcelo Barbosa Henriques

coorientador: Dr. Fábio Parra Sellera

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Fevereiro - 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, São Paulo

D719I

Dominguez, Fernanda Freitas

Investigação de bactérias de prioridade global em pescado originário da aquicultura,
comercializado no mercado de peixes de Santos,- São Paulo

v, 37f. ; fig . ; tab .

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e
Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
Orientador: Marcelo Barbosa Henriques

1. Antimicrobianos. 2. Bacteriologia..3. Contaminação de alimentos. 4. Microbiologia.
5. Segurança alimentar. I. Henriques, Marcelo Barbosa II. Título.

CDD 576

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da dissertação: “Investigação de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos em pescado originário da aquicultura e comercializado no mercado municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil”

AUTOR: Fernanda Freitas Dominguez

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Henriques

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM
AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura e Pesca, pela Comissão
Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Henriques

Dr. João Pedro Rueda Furlan

Prof. Dr. Edison Barbieri

Data da realização: 22 de fevereiro de 2024.

Presidente da Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Henriques

AGRADECIMENTOS

Realizar um mestrado é percorrer um longo caminho que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, incertezas, alegrias e muitos percalços. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Barbosa Henriques, agradeço pelo acolhimento no programa, a confiança que em mim depositou e a orientação, os quais contribuíram com o enriquecimento, não somente do trabalho, mas de um âmbito pessoal.

Ao meu coorientador, Dr. Fábio Parra Sellera, agradeço todas as diretrizes e ensinamentos, ambas pautadas por um elevado nível científico, um interesse permanente e uma visão crítica e oportuna; que favoreceram todas as etapas do trabalho realizado.

Ao Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, agradeço às oportunidades, ensinamentos e instruções, que proporcionaram o progresso da pesquisa.

Ao Felipe Vásquez-Ponce e à Johana Becerra, agradeço o auxílio e os esforços que tornaram possível a concretização deste projeto.

À minha família, agradeço o apoio e motivação incondicional que auxiliou a tornar este trabalho uma válida e agradável experiência de aprendizagem.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVO GERAL	9
OBJETIVO ESPECÍFICO	9
REFERÊNCIAS	10
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	12
Resumo	13
Abstract	14
1. Introdução	15
2. Material e métodos	17
2.1. Amostragem	17
2.2. Preparo das amostras	17
2.3. Isolamento bacteriano	18
2.4. Identificação bacteriana	18
2.5. Teste de sensibilidade	18
2.6. Extração de DNA, sequenciamento genético e análise de bioinformática	19
2.7. Tolerância a metais pesados	19
2.8. Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	20
3. Resultados	20
4. Discussão	28
5. Conclusão	32
Referências	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	36

RESUMO

Este estudo investigou a presença de bactérias de Gram-negativas em filés de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.), peixes provenientes da aquicultura, comumente consumidos crus como sashimi, comercializados no mercado municipal de Santos, São Paulo, Brasil. Selecionou-se para o estudo doze amostras de fragmentos musculares das espécies supracitadas. As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo os meios seletivos ágar MacConkey ou *Pseudomonas*, suplementados com ceftriaxona (2µg/mL), meropenem (2µg/mL), ciprofloxacina (1µg/mL) ou polimixina (1µg/mL). Em seguida, procedeu-se à identificação das colônias bacterianas por meio Espectrômetro de Massas MALDI-TOF-TOF e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Foram selecionadas duas amostras bacterianas e realizados os testes de extração de DNA, sequenciamento genético, análises de bioinformática, tolerância a metais pesados (arsênio, mercúrio, cobre, prata e cromo) de uma das amostras e ensaio *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella*. Das amostras resultantes, 28 isolados foram submetidos a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Constatou-se a presença das bactérias *Aeromonas veronii* (62,06%), *Morganella morganii* (17,24%), *Pseudomonas otitidis* (6,89%), *Acinetobacter baumannii* (3,44%), *Aeromonas jandaei* (3,44%) e *Citrobacter braakii* (3,44%). As espécies de peixes que apresentaram maior contaminação foram pangásio (62,06%), seguidos por tilápia (20,68%) e salmão (17,24%). Uma das bactérias selecionadas, *P. otitidis*, apresentou apenas o gene de resistência *POM-1* e nenhum gene de virulência. Já a outra bactéria, *M. morganii*, apresentou diversos genes de resistência, incluindo a arsênio e mercúrio, e virulência; assim como taxa de sobrevivência de apenas 10% no ensaio com *Galleria mellonella*. A hipótese deste estudo é que o pescado comercializado no mercado municipal de peixes de Santos pode estar sujeito a contaminação por bactérias de Gram-negativas, representando um potencial risco para a saúde pública. Os resultados indicam a presença de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos nos tecidos (filés) das três espécies estudadas, ressaltando a necessidade de aprimorar as práticas de higienização ao longo da cadeia de produção, com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação do produto final. Em suma, este trabalho contribuirá com a proteção da saúde dos consumidores, promoção de segurança alimentar e com o avanço do conhecimento científico no campo da microbiologia de alimentos.

Palavras-chave: Antimicrobianos; bacteriologia; contaminação de alimentos; microbiologia; segurança alimentar.

ABSTRACT

This study investigated the presence of Gram-negative bacteria in fillets of salmon (*Oncorhynchus* sp.), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pangasius (*Pangasianodon* sp.), fish from aquaculture, commonly consumed raw as sashimi, sold in the municipal market of Santos, São Paulo, Brazil. Twelve samples of muscle fragments from the aforementioned species were selected for the study. The samples were sown in Petri dishes containing MacConkey or *Pseudomonas* agar selective media, supplemented with ceftriaxone (2µg/mL), meropenem (2µg/mL), ciprofloxacin (1µg/mL) or polymyxin (1µg/mL). Then, the bacterial colonies were identified using the MALDI-TOF-TOF Mass Spectrometer and antimicrobial susceptibility testing. Two bacterial samples were selected and DNA extraction, genetic sequencing, bioinformatics analysis, tolerance to heavy metals (arsenic, mercury, copper, silver and chromium) tests were carried out on one of the samples and in vivo testing with *Galleria mellonella* larvae. Of the resulting samples, 28 isolates were subjected to identification and antimicrobial susceptibility testing. The presence of the bacteria *Aeromonas veronii* (62,06%), *Morganella morganii* (17,24%), *Pseudomonas otitidis* (6,89%), *Acinetobacter baumannii* (3,44%), *Aeromonas jandaei* (3,44%) and *Citrobacter braakii* (3,44%) was found. The fish species that showed the greatest contamination were pangasius (62,06%), followed by tilapia (20,68%) and salmon (17,24%). One of the selected bacteria, *P. otitidis*, presented only the *POM-1* resistance gene and no virulence gene. The other bacterium, *M. morganii*, presented several resistance genes, including arsenic and mercury, and virulence; as well as a survival rate of only 10% in the trial with *Galleria mellonella*. The hypothesis of this study is that fish sold in the Santos municipal fish market may be subject to contamination by Gram-negative bacteria, representing a potential risk to public health. The results indicate the presence of Gram-negative bacteria resistant to antimicrobials in the tissues (fillets) of the three species studied, highlighting the need to improve hygiene practices throughout the production chain, with the aim of reducing the risks of final product contamination. In short, this work will contribute to protecting consumer health, promoting food safety and advancing scientific knowledge in the field of food microbiology.

Keywords: Antimicrobials; bacteriology; food contamination; food security; microbiology.

INTRODUÇÃO GERAL

Salmão (Oncorhynchus sp.), tilápia (Oreochromis sp.) e pangásius (Pangasianodon sp.) e sua importância econômica

Entre todas as fontes de proteína animal comercializadas mundialmente, os peixes representam 56% do total. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), existem 100 vezes mais espécies de pescado comercializadas no mundo do que todas as espécies de suínos, aves e bovinos (FAO, 2022).

O salmão (*Oncorhynchus* sp.) é uma espécie que tem sua origem na água doce e, após dois a três anos, dirige-se ao oceano (água salgada) e retorna à água doce em período de reprodução. Entre as principais espécies da piscicultura importadas pelo Brasil no primeiro trimestre de 2022, o salmão apresentou o maior valor, totalizando US\$ 216 milhões, um aumento de 66% frente a 2021 (Associação Brasileira da Piscicultura, 2022).

A tilápia (*Oreochromis* sp.) é uma espécie tropical que prefere viver em águas rasas, onde a temperatura ideal varia de 31°C a 36°C. É um onívoro que se alimenta de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, fauna bentônica, detritos e filmes bacterianos associados a detritos (FAO, 2009). A tilápia foi o destaque da piscicultura brasileira em 2020, sua produção cresceu 12,5%, atingindo 486.155 toneladas (contra 432.149 toneladas do ano anterior) (Associação Brasileira da Piscicultura, 2022). Em 2021, foram produzidas 534.005 toneladas da espécie no Brasil, um salto de 9,8% ante o ano anterior (486.155 toneladas). Com esse resultado, a tilápia representa 63,5% da produção nacional de peixes de cultivo, conforme os dados do Anuário 2022 da Associação Brasileira da Piscicultura (Seafood Brasil, 2022).

O pangásius (*Pangasianodon* sp.), originário do Vietnã, tem como temperatura ideal para cultivo de 23°C a 29°C (Seafood Brasil, 2019). Em 2020, o pangásius, a carpa e a truta mostraram bom desempenho, com crescimento de 10,9%, somando 38.104 toneladas contra 34.370 toneladas de 2019. No terceiro trimestre de 2021, entre as principais espécies da piscicultura importadas pelo Brasil, os bagres (incluindo o pangásius) ocuparam o segundo lugar, com US\$ 13,9 milhões (Associação Brasileira da Piscicultura, 2021).

No entanto, à medida que a demanda global por pescado cresce, questões críticas como a resistência aos antimicrobianos e a contaminação de alimentos emergem como desafios urgentes na indústria aquícola. Esses problemas não apenas afetam a segurança alimentar, mas também têm implicações significativas para a saúde pública.

Crescente contaminação de alimentos por bactérias

A demanda e o consumo de alimentos aumentam constantemente em todo o mundo com o aumento da população global. Consequentemente, associadas ao manuseio de volumes aumentados de produtos alimentícios em vários estágios de produção, classificação, processamento e/ou embalagem de alimentos, as doenças transmitidas por alimentos tornaram-se cada vez mais uma preocupação de saúde global (De Florio *et al.*, 2021).

A determinação de Procedimentos Padronizados de Higienização Operacional (PPHO) adequados são medidas essenciais para todas as agroindústrias de alimentos (Coelho *et al.*, 2021). Estes procedimentos visam eliminar resíduos orgânicos e micro-organismos oriundos da linha de produção, para que não se depositem na superfície dos maquinários e favoreça a formação de biofilmes, o que consequentemente, contribuiria para a contaminação microbiológica dos produtos, interferindo diretamente na qualidade e segurança do que é oferecido ao consumidor (Fabiano *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2021).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estima que todos os anos aproximadamente 48 milhões de pessoas contraem doenças transmitidas por alimentos, das quais 128.000 são hospitalizadas e 3.000 morrem (Centers for Disease Control and Prevention, 2018).

No Brasil, no período de 2009 a 2019, foram realizadas 7.674 notificações à Vigilância Sanitária, onde ocorreram, também, registros de 109 óbitos. Neste período, os surtos por doenças transmitidas por alimentos confirmados laboratorialmente somaram o total de 2226, onde 1870 (84%) dos agentes etiológicos identificados eram bactérias (Amaral *et al.*, 2021). Entre os dez principais agentes etiológicos envolvidos, a bactéria *Escherichia coli* representou 645 (29%) do total, seguido de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, com 378 (17%) e 356 (16%), respectivamente (Amaral *et al.*, 2021).

Panorama e crise mundial de resistência aos antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos (AMR, da sigla em inglês) é atualmente considerada um dos maiores problemas para a saúde pública global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a definição de AMR refere-se à capacidade de micro-organismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) se alterarem quando expostos a antimicrobianos e de resistirem a esses medicamentos, tornando-os inefetivos (World Health Organization, 2017).

Múltiplos relatórios recentes descreveram um aumento de organismos multirresistentes durante a pandemia de COVID-19. Um estudo retrospectivo descobriu que a incidência de colonização por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos aumentou de 6,7% em 2019 para 50% em março-abril de 2020. Relatou-se que, durante a pandemia, a necessidade do uso de agentes antimicrobianos aumentou em comparação com os anos anteriores (Lai *et al.*, 2021). Em um relatório inicial de 99 casos de COVID-19 na China, mais de 70% dos pacientes receberam tratamento com antimicrobianos e, aproximadamente, 15% dos quais receberam agentes antifúngicos (Lai *et al.*, 2021).

O uso inadequado e excessivo de antimicrobianos na agropecuária também contribui para o aumento da incidência da AMR em humanos (Silva *et al.*, 2020). Esses medicamentos são utilizados na produção animal com o propósito de tratar e prevenir infecções, bem como para promover o crescimento animal, promovendo pressão seletiva e favorecendo a disseminação de micro-organismos resistentes. A transmissão para humanos pode ocorrer de forma direta, mediante contato, ou indireta, no consumo do alimento e pela poluição provocada pelos resíduos biológicos agrícolas (Silva *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021).

Na piscicultura, diversos microrganismos ocasionam perdas na produção do pescado, principalmente quando resistentes a antimicrobianos. Estes patógenos, presentes na microbiota da água e de organismos aquáticos, provocam enfermidades nestes animais, causando perdas econômicas consideráveis ao produtor (Lintzmaia *et al.*, 2021).

Contaminação de pescado

O pescado integra o grupo dos alimentos altamente perecíveis e exige cuidados especiais, uma vez que é suscetível à contaminação dos mais variados micro-organismos, que podem ser adquiridos ainda no ambiente aquático ou durante as diferentes etapas de captura e transporte (Giampietro e Rezende-Lago, 2021).

Em 2020, a pesca e a produção aquícola atingiram um recorde histórico de 214 milhões de toneladas, movimentando cerca de US\$ 424 bilhões. O resultado representou um aumento marginal de 3% no volume sobre o estudo anterior, que consolidou dados de 2018: 178 milhões de toneladas foram de animais aquáticos e 36 milhões foram de algas. O crescimento limitado se deveu principalmente à queda de 4,4% nas capturas, especialmente em razão da diminuição dos volumes de peixes pelágicos, além de uma redução na atividade chinesa e os impactos globais da Covid-19. Já a aquicultura cresceu 5,7% na soma do cultivo de algas e animais aquáticos, alcançando um volume de 122,6 milhões de toneladas em todo o mundo - resultado também contido pelos reflexos da pandemia global (FAO, 2022).

A manutenção da qualidade do pescado está ligada, principalmente, a três fatores: tempo, higiene e temperatura. Além disso, o conhecimento das doenças, o controle do uso de drogas, da alimentação, da qualidade de água e da presença de agentes patogênicos em todas as etapas do processo de produção aquícola é fundamental para a obtenção de produtos de boa qualidade e proteção da saúde pública (Lintzmaia *et al.*, 2021).

Dentre os micro-organismos de maior evidência associados ao pescado, destacam-se *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. A existência dessas bactérias nos alimentos é um indicativo de condições higiênica-sanitária inapropriadas (Sales *et al.*, 2021).

Altas concentrações de metais e outros elementos acima do nível natural em pescados têm sido mensurados devido seus riscos à saúde humana. Em razão do potencial e/ou real perigo do consumo de pescado com expressivos teores de metais tóxicos, muitos países monitoram os níveis desses elementos traços no pescado consumido localmente para proteger a saúde humana. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é a responsável pela fiscalização de contaminantes em alimentos por meio dos Limites Máximos de Tolerância (LMT) para contaminantes inorgânicos publicados na Resolução nº 42, de 29 de agosto de 2013 (EMBRAPA, 2016).

A hipótese deste estudo é que o pescado comercializado no mercado municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil, pode estar sujeito a contaminação por bactérias de prioridade global, representando um potencial risco para a saúde pública

OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de bactérias de prioridade global no tecido (filés) de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.) comercializados para consumo como sashimi.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Isolar e identificar bactérias Gram-negativas (enterobactérias e bactérias não fermentadoras de glicose) resistentes aos antimicrobianos;

Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados bacterianos aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

Amaral, S.M.B., Almeida, A.P.F., Silva, F.S., Silva, Y.Y.V., Damaceno, M.N. 2021. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. *Revista Científica Multidisciplinar* 2, 211935-211935. <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i11.935>.

Associação Brasileira da Piscicultura. 2021. Resumo do 3º trimestre de 2021. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/exportacao-3-tri-2021/>. Acesso em 20 de abril de 2023.

Associação Brasileira da Piscicultura. 2022. Exportação 1º trimestre de 2022. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/exportacao-1tri-2022/>. Acesso em 20 de abril de 2023.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018. Burden of foodborne illness: Findings | Estimates of foodborne illness. Disponível em: www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html. Acesso em 16 de novembro de 2022.

Coelho, R.H., Moura, G.S., Andrade, V.O., 2021. Contaminação de alimentos e seus fatores predisponentes: uma revisão integrativa. *Brazilian Journal of Health Review* 4, 10071-10087. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-041>.

De Florio, W., Liu, S., White, A.R., Taylor, T.M., Cisneros-Zevallos, L., Min, Y., Scholar, E.M.A., 2021. Recent developments in antimicrobial and antifouling coatings to reduce or prevent contamination and cross-contamination of food contact surfaces by bacteria. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 3093-3134. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12750>.

Embrapa. 2016. Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157184/1/BP-126.pdf>. Acesso em 27 de fevereiro de 2024.

Fabiano, G.G., Agüera, R.G., Prado, D.B., 2020. Eficiência de detergentes na remoção de biofilmes de cepa de *Escherichia coli* em superfície de aço inoxidável. *Revista Uninga* 57, 46-56. <https://doi.org/10.46311/2318-0579.57.4.046-056>.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2009. *Oreochromis niloticus*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Rakocy, J. E. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. CD-ROM (multilingual). Disponível em: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_niletilapia.htm. Acesso em 20 de abril de 2023.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2022. Food safety risk analysis. World fisheries and aquaculture. Disponível em: <https://www.aquaculturebrasil.com/noticia/378/relatorio-da-faosofia-2022-destaca-estabilidade-da-producao-global-de-pescado>

mundial#:~:text=Em%202020%2C%20a%20pesca%20e,cerca%20de%20US%24%20424%20bilh%C3%B5es. Acesso em 20 de abril de 2023.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2022. Food safety risk analysis. Perspectiva Global Reportagens Humanas. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/06/1790912>. Acesso em 20 de abril de 2023.

Giampietro, A., Rezende-lago, N.C.M. 2021. Qualidade do gelo utilizado na conservação de pescado fresco. Arquivos do Instituto Biológico 76, 505-508. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5052009>.

Lai, C.C, Chen, S.Y, Ko, W.C., Hsueh, P.R., 2021. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. International journal of antimicrobial agents 57, 106324. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106324>.

Lintzmaia, D.J.H, Rebelatto, I.S., Santos, A.R., Costa, S.B.D., Ritter, D.O., Lanzarin, M. 2021. Emerging bacteria in the nutritional quality of fish. Brazilian Journal of Development 7, 95657-95662. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n10-063>.

Ma, F., Xu, S., Tang, Z., Li, Z., Zhang, L., 2021. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. Biosafety and Health 3, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>.

Sales, B.C.F., Silva, C.P., Laporta, M.Z., Siliano, P.R. 2021. Identificação de enterobactérias em sushi embalados. Unisanta BioScience 10, 7-11. Disponível em: <https://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/viewFile/2624/1938>. Acesso em 23 de novembro de 2022.

Seafood Brasil. 2019. Panga brasileiro x panga importado. Disponível em: <https://www.seafoodbrasil.com.br/panga-brasileiro-x-panga-importado>. Acesso em 20 de abril de 2023.

Seafood Brasil. 2022. Tilápia representa 63,5% da produção de peixes no Brasil em 2021 Disponível em: <https://www.seafoodbrasil.com.br/tilapia-representa-635-da-producao-de-peixes-no-brasil-em-2021>. Acesso em 20 de abril de 2023.

Silva, M.V., Raimundo, I.T., Falcochio, M.C., Souza, B.M.S., 2020. Dinâmica da carga microbiana de uma unidade de beneficiamento de carne e produtos cárneos. Ars Veterinaria 36, 72-77. <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n2p72-77>.

Silva, R.A, Oliveira, B.N.L., Silva, L.P.A, Oliveira, M.A., Chaves, G.C, 2020. Resistência a Antimicrobianos: A formulação da resposta no âmbito da saúde global. R. Saúde em Debate 44, 607-623. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>.

World Health Organization, 2017. Antimicrobial Resistance fact sheets - What is antimicrobial resistance?. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/75/en/>. Acesso em 16 de novembro de 2022.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Investigação de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos em pescado originário da aquicultura e comercializado no mercado municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil”

Artigo redigido nas normas do periódico científico

Microbial Pathogenesis

QUALIS A3

Resumo

Este estudo investigou a presença de bactérias de Gram-negativas em filés de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.), peixes provenientes da aquicultura, comumente consumidos crus como sashimi, comercializados no mercado municipal de Santos, São Paulo, Brasil. Selecionou-se para o estudo doze amostras de fragmentos musculares das espécies supracitadas. As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo os meios seletivos ágar MacConkey ou *Pseudomonas*, suplementados com ceftriaxona (2µg/mL), meropenem (2µg/mL), ciprofloxacina (1µg/mL) ou polimixina (1µg/mL). Em seguida, procedeu-se à identificação das colônias bacterianas por meio Espectrômetro de Massas MALDI-TOF-TOF e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Foram selecionadas duas amostras bacterianas e realizados os testes de extração de DNA, sequenciamento genético, análises de bioinformática, tolerância a metais pesados (arsênio, mercúrio, cobre, prata e cromo) de uma das amostras e ensaio *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella*. Das amostras resultantes, 28 isolados foram submetidos a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Constatou-se a presença das bactérias *Aeromonas veronii* (62,06%), *Morganella morganii* (17,24%), *Pseudomonas otitidis* (6,89%), *Acinetobacter baumannii* (3,44%), *Aeromonas jandaei* (3,44%) e *Citrobacter braakii* (3,44%). As espécies de peixes que apresentaram maior contaminação foram pangásio (62,06%), seguidos por tilápia (20,68%) e salmão (17,24%). Uma das bactérias selecionadas, *P. otitidis*, apresentou apenas o gene de resistência *POM-1* e nenhum gene de virulência. Já a outra bactéria, *M. morganii*, apresentou diversos genes de resistência, incluindo a arsênio e mercúrio, e virulência; assim como taxa de sobrevivência de apenas 10% no ensaio com *Galleria mellonella*. A hipótese deste estudo é que o pescado comercializado no mercado municipal de peixes de Santos pode estar sujeito a contaminação por bactérias de Gram-negativas, representando um potencial risco para a saúde pública. Os resultados indicam a presença de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos nos tecidos (filés) das três espécies estudadas, ressaltando a necessidade de aprimorar as práticas de higienização ao longo da cadeia de produção, com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação do produto final. Em suma, este trabalho contribuirá com a proteção da saúde dos consumidores, promoção de segurança alimentar e com o avanço do conhecimento científico no campo da microbiologia de alimentos.

Palavras-chave: Antimicrobianos; bacteriologia; contaminação de alimentos; microbiologia; segurança alimentar.

Abstract

This study investigated the presence of Gram-negative bacteria in fillets of salmon (*Oncorhynchus* sp.), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pangasius (*Pangasianodon* sp.), fish from aquaculture, commonly consumed raw as sashimi, sold in the municipal market of Santos, São Paulo, Brazil. Twelve samples of muscle fragments from the aforementioned species were selected for the study. The samples were sown in Petri dishes containing MacConkey or *Pseudomonas* agar selective media, supplemented with ceftriaxone (2µg/mL), meropenem (2µg/mL), ciprofloxacin (1µg/mL) or polymyxin (1µg/mL). Then, the bacterial colonies were identified using the MALDI-TOF-TOF Mass Spectrometer and antimicrobial susceptibility testing. Two bacterial samples were selected and DNA extraction, genetic sequencing, bioinformatics analysis, tolerance to heavy metals (arsenic, mercury, copper, silver and chromium) tests were carried out on one of the samples and in vivo testing with *Galleria mellonella* larvae. Of the resulting samples, 28 isolates were subjected to identification and antimicrobial susceptibility testing. The presence of the bacteria *Aeromonas veronii* (62,06%), *Morganella morganii* (17,24%), *Pseudomonas otitidis* (6,89%), *Acinetobacter baumannii* (3,44%), *Aeromonas jandaei* (3,44%) and *Citrobacter braakii* (3,44%) was found. The fish species that showed the greatest contamination were pangasius (62,06%), followed by tilapia (20,68%) and salmon (17,24%). One of the selected bacteria, *P. otitidis*, presented only the *POM-1* resistance gene and no virulence gene. The other bacterium, *M. morganii*, presented several resistance genes, including arsenic and mercury, and virulence; as well as a survival rate of only 10% in the trial with *Galleria mellonella*. The hypothesis of this study is that fish sold in the Santos municipal fish market may be subject to contamination by Gram-negative bacteria, representing a potential risk to public health. The results indicate the presence of Gram-negative bacteria resistant to antimicrobials in the tissues (fillets) of the three species studied, highlighting the need to improve hygiene practices throughout the production chain, with the aim of reducing the risks of final product contamination. In short, this work will contribute to protecting consumer health, promoting food safety and advancing scientific knowledge in the field of food microbiology.

Keywords: Antimicrobials; bacteriology; food contamination; food security; microbiology.

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos (AMR), definida como a capacidade dos micro-organismos de se adaptarem e resistirem aos antimicrobianos, representa uma ameaça crescente para a saúde pública global (World Health Organization, 2017).

Esta ameaça se manifesta em todo o mundo, contribuindo substancialmente para a morbidade e mortalidade (Tacconelli *et al.*, 2018). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde publicou uma lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos para bactérias de prioridade global. No topo da lista, encontram-se bactérias de prioridade crítica como *Acinetobacter baumannii* (resistente a carbapenêmicos), *Pseudomonas aeruginosa* (resistente a carbapenêmicos) e enterobactérias (resistente a carbapenêmicos e produtoras de ESBL) (Tacconelli *et al.*, 2018).

O uso excessivo de antimicrobianos na agropecuária também contribui significativamente para o aumento da incidência da resistência aos antimicrobianos em humanos. Esses medicamentos são frequentemente utilizados na produção animal com o propósito de tratar e prevenir infecções, bem como para promover o crescimento animal. No entanto, esse uso indiscriminado exerce pressão seletiva sobre os micro-organismos, levando ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes. A transmissão dessas bactérias resistentes aos seres humanos pode ocorrer de forma direta, mediante contato, ou indiretamente, através do consumo de alimento contaminados e da contaminação provocada pelos resíduos biológicos agrícolas (Silva *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021).

Dentre os micro-organismos frequentemente associados ao pescado, destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. A existência dessas bactérias nos alimentos é um indicativo de condições higiênico-sanitárias inapropriadas (Sales *et al.*, 2021). No Brasil, entre 2009 a 2019 foram realizadas 7.674 notificações à Vigilância Sanitária Brasileira, das quais 84% envolviam agentes etiológicos bacterianos. Entre os dez principais agentes etiológicos envolvidos, a bactéria *E. coli* representou 645 (29%) do total, seguido de *Salmonella* spp. e *S. aureus*, com 378 (17%) e 356 (16%), respectivamente (Amaral *et al.*, 2021).

Altas concentrações de metais e outros elementos acima do nível natural em pescados têm sido mensurados devido seus riscos à saúde humana. Em razão do potencial e/ou real perigo do consumo de pescado com expressivos teores de metais tóxicos, muitos países monitoram os níveis desses elementos traços no pescado

consumido localmente para proteger a saúde humana. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é a responsável pela fiscalização de contaminantes em alimentos por meio dos Limites Máximos de Tolerância (LMT) para contaminantes inorgânicos publicados na Resolução nº 42, de 29 de agosto de 2013 (EMBRAPA, 2016).

Neste contexto, a resistência antimicrobiana representa uma ameaça à saúde humana, animal e até mesmo ambiental; sendo necessários estudos que identifiquem e abordem riscos significativos à saúde associados ao consumo de peixes contaminados com bactérias resistentes a antimicrobianos. Uma vez que os antimicrobianos são amplamente utilizados em animais destinados à produção de alimentos, esses animais podem servir como reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos.

Diante deste panorama, emerge a necessidade de investigar a presença de bactérias clinicamente importantes em peixes de aquicultura. Este estudo visa isolar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade de bactérias Gram-negativas nos filés de salmão, tilápia e pangásius destinados ao consumo como sashimi, com o objetivo de compreender e mitigar os riscos associados à resistência aos antimicrobianos na cadeia alimentar desses peixes. A hipótese deste estudo é que o pescado produzido por aquicultura e comercializado no mercado municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil, pode estar sujeito a contaminação por bactérias clinicamente importantes, representando um potencial risco para a saúde pública. Esta pesquisa busca preencher essa lacuna no conhecimento e contribuir para a compreensão dos riscos associados à resistência aos antimicrobianos na cadeia alimentar de peixes de aquicultura, bem como para o desenvolvimento de estratégias de mitigação eficazes.

Ao considerar os dados apresentados sobre a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em peixes de aquicultura, é evidente a urgência de compreender e abordar a relevância da resistência antimicrobiana na cadeia alimentar. Nesse contexto, os objetivos específicos deste estudo ganham destaque, uma vez que visam identificar as bactérias presentes nos filés de peixe e avaliar sua sensibilidade aos antimicrobianos. Portanto, ressalta-se a necessidade premente de investigações detalhadas para promover uma produção e consumo de alimentos mais seguros e saudáveis.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

No mês de abril de 2022, foram coletadas para o estudo 12 (doze) amostras de peixes provenientes do Mercado Municipal de Pescado de Santos - SP (23° 59' S, 46° 17' W). As amostras consistiam de fragmentos musculares de espécies comumente consumidas cruas, sendo 03 (três) de salmão (*Oncorhynchus* sp.), 03 (três) de tilápia (*Oreochromis niloticus*), 03 (três) de pangásio (*Pangasianodon* sp.) (Figura 1). Adicionalmente, 03 (três) amostras de pangásio que não possuíam registro fiscal também foram coletadas para processamento.

Após a coleta, os fragmentos foram transportados sob refrigeração para o laboratório do departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e processados em um período de 24 horas.



Figura 1. Processo de coleta de fragmento muscular de pescado proveniente Mercado Municipal de Pescado de Santos (SP).

2.2. Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis com o equipamento homogeneizador de sólidos ou Stomacher (Boitton™) e, em seguida, foram

transferidas para garrafas estéreis, submersas em água peptonada e levadas à uma incubadora shaker (Cientec™) por 24 horas à 37°C e 50 rpm.

2.3. *Isolamento bacteriano*

A análise bacteriológica das amostras foi realizada através do isolamento em meio seletivo suplementados com antimicrobianos. Foi realizada uma diluição 10^{-4} das amostras com solução salina e, igualmente com amostras puras (sem diluição), foram semeadas em diferentes placas contendo os meios de cultura ágar MacConkey ou *Pseudomonas*, suplementados com ceftriaxona (2µg/mL), meropenem (2µg/mL), ciprofloxacina (1µg/mL) ou polimixina (1µg/mL) cada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, e as colônias crescidas foram observadas quanto ao tamanho, pigmentação e morfologia.

2.4. *Identificação bacteriana*

Após o crescimento bacteriano, colônias representativas foram escolhidas e submetidas a análises para identificação. A identificação das espécies bacterianas foi realizada por meio de espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).

2.5. *Teste de sensibilidade*

Para determinação do perfil de sensibilidade dos isolados, foi realizado o teste de difusão em disco proposto por Kirby e Bauer (1966). Colônias de cada bactéria previamente identificada foram suspensas em 3 mL de solução salina (H₂O + NaCl 0,85%) e ajustadas em escala McFarland 0,5 por meio de espectrofotômetro. Após, um *swab* estéril foi mergulhado nesta solução e semeado numa placa Muller Hinton e, em seguida, foram distribuídos os discos antimicrobianos amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), meropenem (MPM 10 µg), imipenem (IPM 10 µg), ertapenem (ERT 10 µg), cefepime (CPM 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), gentamicina (GEN 10 µg) e cloranfenicol (CLO 30 µg). As placas foram levadas à estufa bacteriológica

por 37°C por 24 horas e, após este período, foi observado e mensurado os halos dos antimicrobianos. Uma amostra de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) foi submetida a um teste de sensibilidade similar ao anterior, todavia, com tetraciclina (TET 30 µg). Os resultados foram interpretados de acordo com diretrizes da organização americana *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022). Adicionalmente, os isolados bacterianos foram classificados como sensíveis, resistentes ou multirresistentes de acordo com critério proposto por Magiorakos *et al.* (2012).

2.6. Extração de DNA, sequenciamento genético e análise de bioinformática

O DNA genômico de duas amostras, sendo elas uma de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) e outra de *Pseudomonas otitidis* (PG/S.P.MER.3), foram extraídos utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante; e em seguida foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina NextSeq (San Diego, EUA). Montagens de novo foram geradas usando Unicycler (0.4.8) (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Ferramentas do Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org>) foram usadas para confirmar espécies (SpeciesFinder v2.0) e para identificar o tipo de sequência multi-locus (MLST v2.0). ABricate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) foi usado com ResFinder (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/resfinder_db) e VFDB ([https://bitbucket.org/genomicepidemiology/virulencefinder_db/src /master/](https://bitbucket.org/genomicepidemiology/virulencefinder_db/src/master/)). Foi utilizado um limite mínimo de 90% para identidade de nucleotídeos e cobertura genética.

Para acessar a relação filogenética, 27 genomas de cepas de *Morganella morganii* foram recuperados do banco de dados NCBI RefSeq, e uma árvore de máxima verossimilhança baseada no alinhamento de SNP foi inferida com parâmetros padrão do CSI Phylogeny v.1.4 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>), usando o cromossomo completo da cepa MGYG-HGUT-02512 de *M. morganii* (número de acesso do GenBank: LR699007.1) como referência. A visualização e anotação da topologia em árvore foram realizadas com o iTol v.6 (<http://itol.embl.de/>).

2.7. Tolerância a metais pesados

A tolerância ao arsênio (As), mercúrio (Hg), cobre (Cu), prata (Ag) e cromo (Cr) da amostra de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) foi avaliada utilizando um método de microdiluição em caldo a fim de se concentração inibitória mínima (MIC) (CLSI, 2022). *Klebsiella pneumoniae* cepa KPN535 (One260, <http://www.onehealthbr.com/>), contendo mercúrio (merA-C), arsênico (arsA-D, arsH), genes de resistência ao cobre (pcoA-E, pcoR-S), prata (silR-S, silC, silE) e níquel (nikA-E), e a cepa 25922 de *Escherichia coli* ATCC, negativa para a presença dos genes que conferem tolerância aos metais pesados testados, foram utilizados como controle.

2.8. Ensaio in vivo com *Galleria mellonella*

Foi realizado ensaio com larvas de *Galleria mellonella* criadas e mantidas à 28°C e alimentadas com pólen e cera de abelha. Foi feita triplicata, sendo cada grupo experimental composto por 10 larvas pesando entre 200-230 mg. Estas receberam injeção sistêmica de 5µL no penúltimo proleg direito, cujo continham solução PBS com diluição 10^{-4} de amostra de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) (Loulou *et al.* 2023). Também foi realizado o ensaio com a amostra de *M. morganii* ATCC 25829 (GenBank L34345.1), *Pseudomonas otitidis* (PG/S.P.MER.3) e apenas com solução PBS como controle. A sobrevivência das larvas foi avaliada a cada hora por estímulo ao toque.

3. Resultados

O preparo das amostras resultou em 80 placas com crescimento de colônias bacterianas. Destas, 28 foram selecionadas para serem encaminhadas para identificação. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies bacterianas identificadas em amostras de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.) coletadas no municipal de peixes de Santos, São Paulo, Brasil.

Amostras	Espécie de peixe	Meio suplementado	Espécie bacteriana
TL.P.POL.1	Tilápia	Polimixina	<i>Morganella morganii</i>

TL.MAC.CRO.5	Tilápia	Ceftriaxona	<i>Acinetobacter baumannii</i>
PG.MAC.MER.1	Pangasius	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
SAL.P.POL.2	Salmão	Polimixina	<i>Morganella morganii</i>
PG.P.POL.2	Pangasius	Polimixina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG.MAC.POL.5	Pangasius	Polimixina	<i>Morganella morganii</i>
TL.P.MER.2	Tilápia	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
TL.P.MER.1	Tilápia	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
SAL.P.POL.3	Salmão	Polimixina	<i>Morganella morganii</i>
SAL.MAC.CRO.2	Salmão	Ceftriaxona	<i>Citrobacter braakii</i>
SAL.P.CIP.2	Salmão	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
TL.MAC.MER.1	Tilápia	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
PG.P.CIP.1	Pangasius	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG.P.CIP.2	Pangasius	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG.P.MER.1	Pangasius	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.CIP.2	Pangasius (sem registro fiscal)	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.CIP.3	Pangasius (sem registro fiscal)	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.MAC.MER.3	Pangasius (sem registro fiscal)	Meropenem	<i>Pseudomonas otitidis</i>
SAL.MAC.CIP.2	Salmão	Ciprofloxacina	<i>Morganella morganii</i>
PG.MAC.MER.4	Pangasius	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.MER.3	Pangasius (sem registro fiscal)	Meropenem	<i>Pseudomonas otitidis</i>
PG.P.CIP.3	Pangasius	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.MER.2	Pangasius (sem registro fiscal)	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
48hr.PG.P.POL.1	Pangasius	Polimixina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.CIP.1	Pangasius (sem registro fiscal)	Ciprofloxacina	<i>Aeromonas jandaei</i>
PG.P.MER.2	Pangasius	Meropenem	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.POL.2	Pangasius (sem registro fiscal)	Polimixina	<i>Aeromonas veronii</i>
PG/S.P.POL.1	Pangasius (sem registro fiscal)	Polimixina	<i>Aeromonas veronii</i>

Dentre as 28 colônias selecionadas, 50% dos isolados foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico, 7,14% a ceftriaxona, 7,14% a cloranfenicol e 3,57% a cefotaxima. Não foram identificadas bactérias resistentes à ceftazidime, aztreonam, meropenem, imipenem, ertapenem, gentamicina, cefepime, ciprofloxacina e polimixina. Dentre as 28 bactérias selecionadas, apenas cinco apenas 01 (uma) apresentou resistência à colistina (1,03%) (Tabela 2).

De acordo com Magiorakos *et al.* (2012), isolados bacterianos multirresistentes (MDR) podem ser definidos como não suscetíveis a pelo menos um antimicrobiano em

três ou mais categorias antimicrobianas. Desta forma, dentre as 28 colônias selecionadas, nenhuma amostra pode ser classificada como MDR.

Não foram encontradas bactérias de prioridade global, todavia, a presença de bactérias resistentes em peixes que são comumente consumidos crus deve ser tratada como uma questão de saúde pública.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade dos isolados bacterianos recuperados de amostras de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.) coletadas no município de peixes de Santos, São Paulo, Brasil.

Amostra	Espécie bacteriana	AMC	CTX	CAZ	ATM	CRO	MPM	IPM	ERT	CPM	CIP	GEN	CLO	TET
TL.P.POL.1	<i>Morganella morganii</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	
TL.MAC.CRO.5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	I	R	I	-	R	S	S	-	I	I	S	R	
PG.MAC.MER.1	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	-	-	-	S	-	S	S	
SAL.P.POL.2	<i>Morganella morganii</i>	-	S	S	S	S	S	I	S	S	-	S	S	
PG.P.POL.2	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	-	-	-	S	S	S	S	
PG.MAC.POL.5	<i>Morganella morganii</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-	S	S	
TL.P.MER.2	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	S	
TL.P.MER.1	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	S	
SAL.P.POL.3	<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	S	S	S	I	S	S	-	S	S	R
SAL.MAC.CRO.2	<i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-	S	R	S	S	S	S	-	S	S	
SAL.P.CIP.2	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	S	-	I	S	-	S	S	
TL.MAC.MER.1	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	
PG.P.CIP.1	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	S	
PG.P.CIP.2	<i>Aeromonas veronii</i>	S	S	S	S	S	-	I	I	S	-	S	S	
PG.P.MER.1	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	-	-	-	S	-	S	S	
PG/S.P.CIP.2	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	S	-	-	S	-	S	S	
PG/S.P.CIP.3	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	-	-	I	S	-	S	S	

PG/S.MAC.ME R.3	<i>Pseudomonas otitidis</i>	R	S	S	S	S	-	I	-	S	S	S	I
SAL.MAC.CIP. 2	<i>Morganella morganii</i>	R	I	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S
PG.MAC.MER. 4	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	-	-	-	S	-	S	S
PG/S.P.MER.3	<i>Pseudomonas otitidis</i>	R	I	S	S	I	-	-	-	S	-	S	S
PG.P.CIP.3	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	R
PG/S.P.MER.2	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	-	-	-	S	-	S	S
48hr.PG.P.POL. 1	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	-	-	-	S	-	S	I
PG/S.P.CIP.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	R	S	S	S	S	I	-	S	S	-	S	S
PG.P.MER.2	<i>Aeromonas veronii</i>	R	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	S
PG/S.P.POL.2	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	I	-	-	S	-	S	S
PG/S.P.POL.1	<i>Aeromonas veronii</i>	I	S	S	S	S	-	-	-	S	S	S	S

PG = Pangasius; PG/S = Pangasius sem registro; SAL = Salmão; TL = Tilápia; P = Meio *Pseudomonas*; MAC = Meio MacConkey; AMC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CTX = Cefotaxima; CAZ = Ceftazidime; ATM = Aztreonam; CRO = Ceftriaxona; MER = Meropenem; IPM = Imipenem; ERT = Ertapenem; CPM = Cefepime; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; CLO = Cloranfenicol; TET = Tetraciclina; R = Resistente; S = Sensível; I = Intermediário; - = Resistência intrínseca.

Dentre as 28 colônias, as amostras SAL.P.POL.3 (*Morganella morganii*) e PG/S.P.MER.3 (*Pseudomonas otitidis*) foram selecionadas para sequenciamento genético. A amostra de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) apresentou os genes específicos de virulência para *M. morganii* descritos por Chen *et. al.* (2012) *invA*, *mrpA*, *fimH*, *shlA*, *zapA*, *iutA* e *ireA*, enquanto a amostra *Morganella morganii* ATCC 25829 apresentou os genes *invA*, *tibA*, *mrpA*, *fimH*, *hlyA*, *shlA*, *zapA*, *iutA* e *ireA* (Figura 2).

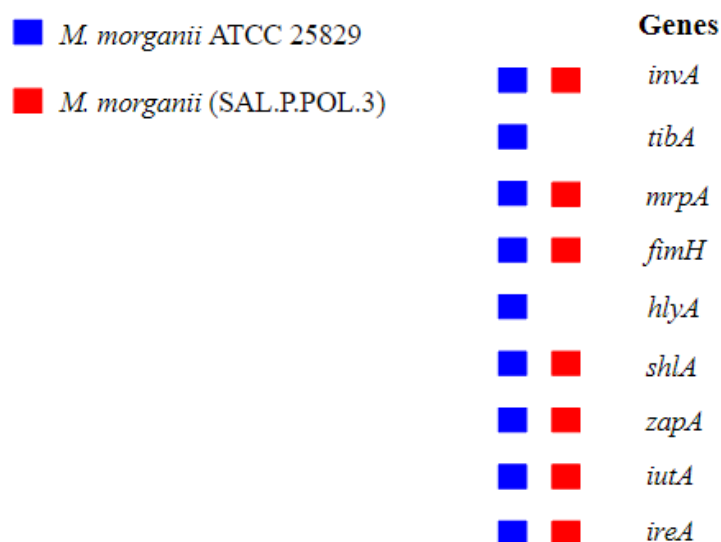


Figura 2. Mapa de viruloma de *Morganella morganii* ATCC 25829 e *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3). As regiões coloridas representam a presença de genes de virulência descritos por Chen *et. al.* (2012). Fragmentos em branco representam sua ausência.

A análise filogenômica realizada foi baseada em SNP de 27 cepas de *M. morganii*, onde nela observa-se que a *M. morganii* (SAL.P.POL.3) (Cepa SQ590) tem relação filogenômica com duas bactérias; a BCZU (Cepa NBRC 3848) e CP069157.1 (Cepa DSM 30164). Os 27 genomas de *M. morganii* foram estabelecidos com base na pesquisa de Loulou *et al.* (2023), além das cepas encontradas na América Latina.

Com o heatmap de genes específicos de virulência de *M. morganii* é possível observar que os genes presentes na amostra *M. morganii* (SAL.P.POL.3) são os mesmos presentes nas amostras com relação filogenômica com a mesma (Figura 3). As cepas *M. morganii* (SAL.P.POL.3) (Cepa SQ590), BCZU (Cepa NBRC 3848) e CP069157.1 (Cepa DSM 30164) têm diferentes país de coleta e ano de coleta; entretanto as duas últimas supracitadas têm como fonte de isolamento fezes humanas (Tabela 3).

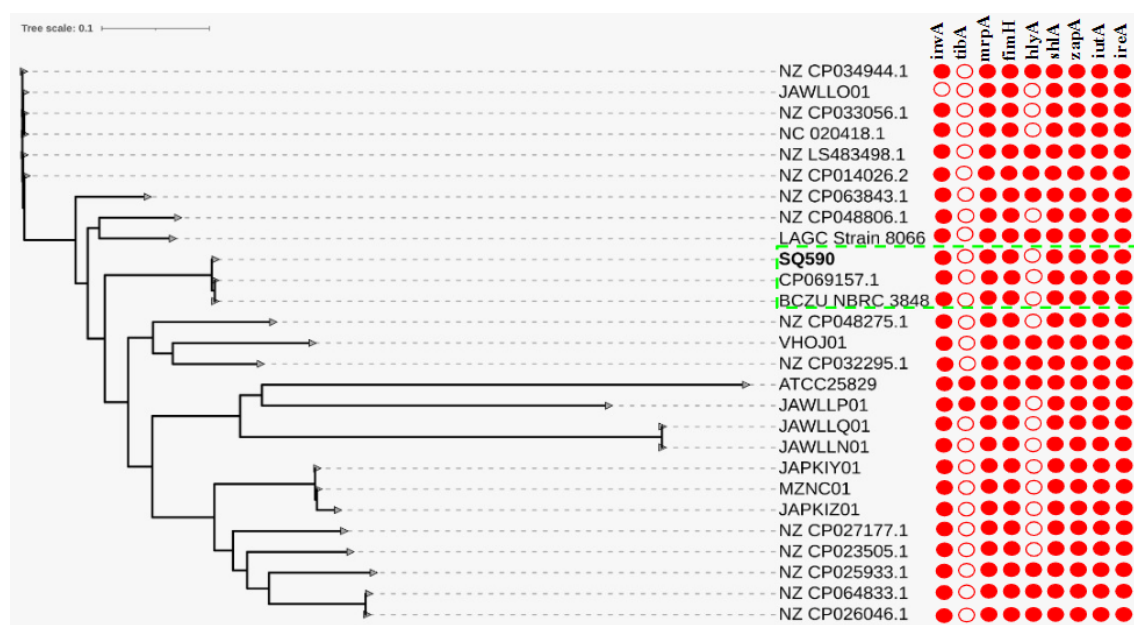


Figura 3. Análise filogenômica baseada em SNP de 27 cepas de *Morganella morganii* e heatmap exibindo genes específicos de virulência de *Morganella morganii*. As regiões coloridas representam a presença dos genes específicos. Fragmentos em branco representam sua ausência. A cepa denominada SQ590 é a amostra *M. morganii* (SAL.P.POL.3).

Tabela 3. Informações sobre as 27 cepas de *Morganella morganii* utilizadas na composição da árvore filogenômica.

Amostra	Cepa	Ano de coleta	País de coleta	Fonte de isolamento
SAL.P.POL.3	SQ590	2022	Brasil	Amostra muscular de salmão
JAWLLQ	JAWLLQ	2022	Colômbia	Fezes humanas
JAWLLP	IPS030	2022	Colômbia	Fezes humanas
JAWLLN	IPS008	2022	Colômbia	Fezes humanas
JAWLLO	IPS012	2022	Colômbia	Fezes humanas
JAPKIY	1189_21	2021	Brasil	Amostra humana
JAPKIZ	445_19	2019	Brasil	Amostra humana
NZ_CP034944.1	ATCC 25830	2019	China	Fezes humanas
NZ_CP027177.1	AR_0057	2018	USA	Amostra humana
NZ_CP03843.1	SMM01	2018	Índia	Urina humana
NZ_CP048806.1	MP63	2018	China	Água residual
NZ_CP048275.1	N18-00103	2018	Canadá	Escarro humano
NZ_LS483498.1	NCTC12028	2018	Inglaterra	Fezes humanas
NZ_CP032295.1	DG56-16	2018	China	Amostra de crocodilo

NZ_CP025933.1	KC-Tt01	2017	Coréia do Sul	Fluido pericárdico humano
VHOJ	4601	2016	Brasil	Amostra humana
NZ_CP033056.1	L241	2016	China	Fezes humanas
NZ_CP064833.1	715394	2016	China	Amostra humana
BCZU	NBRC 3848	2016	Japão	Fezes humanas
LAGC	8066	2015	Canadá	Urolitíase crônica humana
NZ_CP023505.1	FDAARGOS_365	2014	USA	Banco de hospital
NZ_CP014026.2	FDAARGOS-172	2014	USA	Urina humana
MZNC	ICMmBL-II-04(2)	2013	Brasil	Swab retal humano
NZ_CP0260046.1	FDAARGOS_63	2013	USA	Ferimento humano
NC_020418.1	KT	2009	Taiwan	Amostra sanguínea humana
L34345.1	ATCC 25829	2004	USA	Amostra humana
CP069157.1	DSM 30164	1905	Inglaterra	Fezes humanas

A amostra de *P. otitidis* apresentou apenas um gene de resistência, denominado POM-1 (Metallo-beta-lactamase, que confere resistência à carbapenênicos). Já a amostra de *M. morganii* (SAL.P.POL.3) apresentou genes de resistência à cloranfenicol, betalactâmicos, tetraciclina, quaternário de amônio, arsênio e mercúrio; enquanto que a amostra de *M. morganii* ATCC 25829 apresentou resistoma apenas à cloranfenicol, betalactâmicos e tetraciclina (Figura 4).

■ *M. morganii* ATCC 25829

■ *M. morganii* (SAL.P.POL.3)

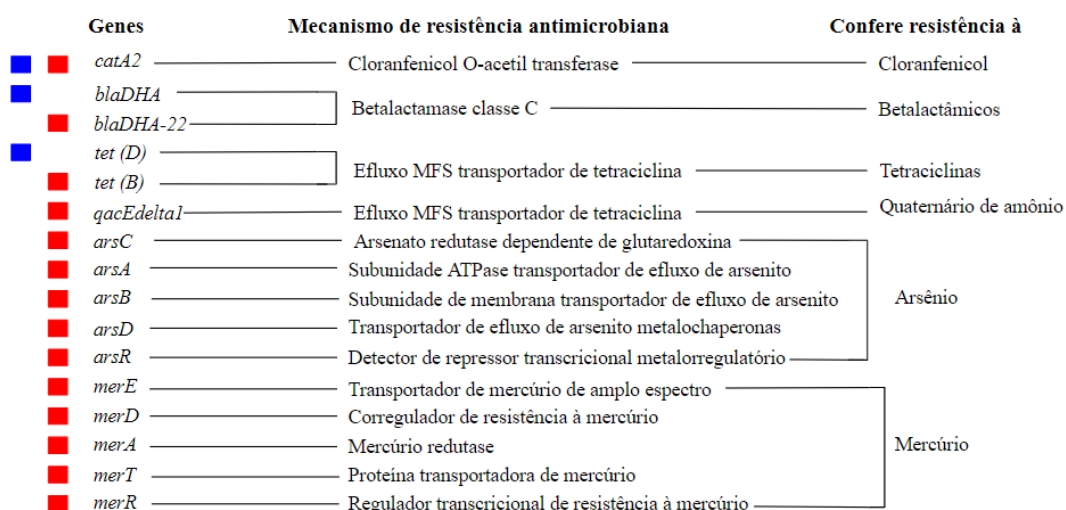


Figura 4. Mapa de resistoma a antimicrobianos e metais pesados de *Morganella morganii* ATCC 25829 e *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3). As regiões coloridas representam a

presença de genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados. Fragmentos em branco representam sua ausência.

Devido à presença de resistomas à metais pesados ou elementos traços, foi realizado teste de tolerância a arsênio (As), cobre (Cu), cromo (Cr), mercúrio (Hg) e prata (Ag) (Tabela 4). A amostra de *M. morganii* (SAL.P.POL.3), cujo apresentou resistoma à arsênio e mercúrio, mostrou uma maior tolerância aos metais pesados do que a amostra de *M. morganii* ATCC 25829 que não tinha tais resistomas. As demais tolerâncias aos metais pesados foram iguais para ambas as amostras.

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de metais pesados para *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) e *Morganella morganii* ATCC 25829, e cepas de controle de *Klebsiella pneumoniae* cepa KPN535 e de *Escherichia coli* ATCC cepa 25922.

Metal pesado	<i>M. morganii</i> (SAL.P.POL.3)	<i>M. morganii</i> ATCC 25829	<i>K. pneumoniae</i> KPN535	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Arsênio (As)	2048 $\mu\text{g/mL}$	1024 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$
Cobre (Cu)	2048 $\mu\text{g/mL}$	2048 $\mu\text{g/mL}$	4096 $\mu\text{g/mL}$	2048 $\mu\text{g/mL}$
Cromo (Cr)	128 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$
Mercúrio (Hg)	8 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
Prata (Ag)	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$

O ensaio *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* utilizando amostra de *Pseudomonas otitidis* (PG/S.P.MER.3) apresentou 100% de taxa de sobrevivência durante o período de 96 horas de observação. Entretanto, o ensaio com a amostra de *M. morganii* (SAL.P.POL.3) apresentou início de mortalidade com 20 horas de observação e 10% de taxa de sobrevivência com 34 horas. A amostra de *M. morganii* ATCC 25829 apresentou início de mortalidade com 15 horas e 0% de taxa de sobrevivência com 19 horas de observação (Figura 5).

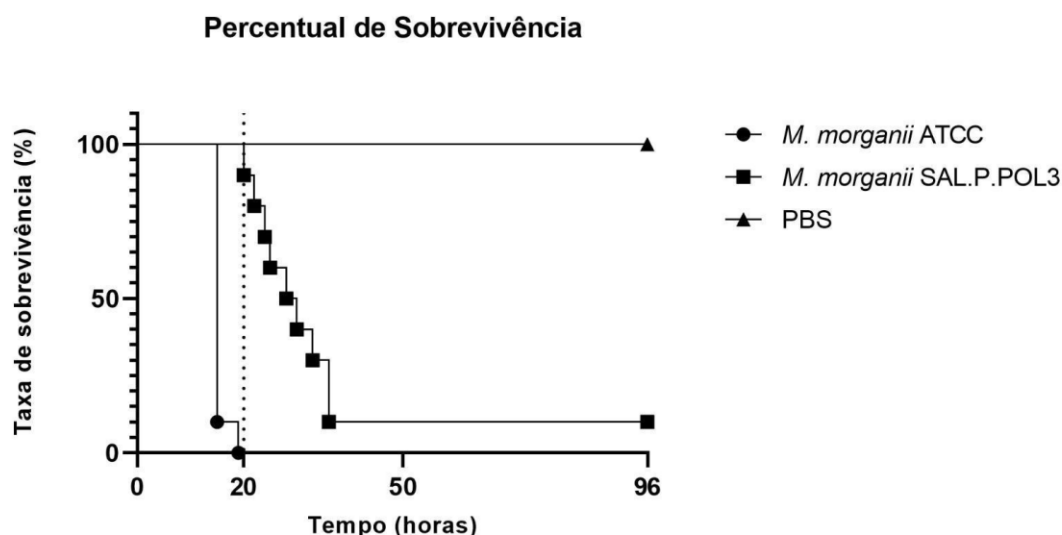


Figura 5. Percentual de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com solução PBS contendo amostra de *Morganella morganii* ATCC 25829, solução PBS contendo amostra de *Morganella morganii* (SAL.P.POL.3) e solução PBS pura.

4. Discussão

A AMR é uma preocupação global crescente que afeta diretamente a saúde pública em um cenário de crescente demanda por alimentos devido ao aumento populacional. O uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos para o controle de doenças ou como promotores de crescimento aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos, levando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana.

Segundo Sales *et al.* (2021), *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os micro-organismos mais encontrados em pescado, o que contrapõe o presente estudo, cujas bactérias identificadas foram *A. veronii* (60,71%), *M. morganii* (17,85%), *P. otitidis* (7,14%), *A. baumannii* (3,57%), *A. jandaei* (3,57%) e *C. braakii* (3,57%). A diferença de micro-organismos encontrados pode ser fundamentada na diferença de material amostrado, visto que estes autores utilizaram pescado na forma de sushi vendido já embalado; sendo, então, um produto muito mais manipulado do que o utilizado na presente pesquisa, podendo ter ocorrido contaminação cruzada ocasionada por manipulação do mesmo.

Para os peixes, as bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas oportunistas, manifestando-se em hospedeiros enfraquecidos por outras infecções, problemas

nutricionais ou estresse (Peixoto *et al.*, 2012). *Aeromonas* spp. são um dos principais causadores de perdas na piscicultura e, normalmente, sua presença em alimentos ocorre quando os mesmos entram em contato com água, habitat natural das diversas espécies e principal fonte de contaminação (Lintzmaia *et al.*, 2021). Das dezoito amostras onde foram identificadas presença de *A. veronii*, quatorze eram de pangásio (77,79%), três eram de tilápia (16,67%) e apenas uma era proveniente de salmão (5,56%). Além disso, das vinte e oito bactérias identificadas, apenas uma era *A. jandaei* (3,44%), proveniente de pangásio sem registro fiscal. Em concordância com Peixoto *et al.* (2012) e com Lintzmaia *et al.* (2021), o perfil de resistência das bactérias *A. veronii* e *A. jandaei* podem ser atribuídos a uma transferência horizontal de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e integrons.

Neste estudo, das 28 bactérias identificadas por Maldi-Tof, cinco eram *M. morgani* (17,85%); sendo destas, três encontradas em amostras de salmão (60%), uma em pangásio (20%) e uma em tilápia (20%). Esta enterobactéria faz parte da microbiota de pescado e é uma das principais produtoras de histamina. Sua presença pode indicar que houve abuso de temperatura em algumas das etapas da cadeia de frio do pescado (Matias, 2019). Em conformidade com Matias (2019), o pescado não conservado adequadamente sob refrigeração está sujeito à produção de histamina por enterobactérias que, caso sejam consumidas por humanos, podem gerar diversos sintomas como dores de cabeça e vômitos, sendo classificados como doença transmitida por alimento (DTA).

De acordo com Vieira *et al.* (2020), as bactérias do gênero *Pseudomonas* são patógenos oportunistas frequentemente relacionados a infecções nosocomiais em humanos. Nos alimentos, essa bactéria é reconhecida como importante no quesito de deterioração do mesmo, ocasionando significativas perdas econômicas na indústria de alimentos. Das duas amostras onde foram identificadas presença de *P. otitidis*, ambas eram de pangásio que não tinham registro fiscal. A presença desta bactéria indica que houve quebra da cadeia de frio do pescado ou de contaminação ambiental ocasionada por manipulação do pescado.

Dentre as vinte e oito bactérias identificadas, apenas uma pertencia a espécie *A. baumannii* (3,57%); sendo esta proveniente de uma amostra de tilápia. Segundo Berigo *et al.* (2021), as bactérias do gênero *Acinetobacter* são encontradas principalmente em ambientes úmidos, como por exemplo, criações de peixes, águas residuais e até mesmo gelo; entretanto, têm capacidade de sobreviver em superfícies secas. De acordo com

Moubareck e Halat (2020), *A. baumannii* pode compor a microbiota bacteriana da pele, cavidade oral, vias respiratórias superiores, trato genital e trato gastrointestinal inferior de pessoas saudáveis. Entretanto, por ser uma bactéria oportunista, nas últimas décadas as espécies de *Acinetobacter* spp. vêm representando patógenos emergentes na ocorrência de infecções nosocomiais, principalmente em unidades de terapia intensiva.

Segundo Ribeiro *et al.* (2021), o gênero *Citrobacter* compreende bactérias encontradas na água, solo, alimentos e no intestino de animais e humanos como comensais, entretanto podem ocasionar infecções em pacientes imunocomprometidos. No presente estudo, de todas as bactérias identificadas, foi constatada a presença de *C. braakii* em apenas uma amostra, sendo a mesma proveniente de salmão. A presença desta bactéria indica que pode ter ocorrido contaminação do alimento ocasionada por manipulação ou por contaminação cruzada.

Correspondendo a um amplo problema mundial, a resistência bacteriana denota que bactérias anteriormente suscetíveis aos antimicrobianos usualmente utilizados não são mais afetadas pelos mesmos. Os perfis de resistência indicam os prováveis mecanismos de resistência dessas bactérias para com os antimicrobianos. Além disso, bactérias com estes perfis de resistência tornam a antibioticoterapia mais complexa, além de inferir na segurança alimentar e no desenvolvimento mundial. A maioria das bactérias identificadas são intrinsecamente resistentes aos antimicrobianos testados; possuindo, também, uma baixa resistência adquirida de importância clínica.

Embora não tenham sido encontradas bactérias de prioridade global da Organização Mundial de Saúde, foi possível detectar outras bactérias que apresentaram resistência a antimicrobianos clinicamente importantes (*e.g.*, quinolonas, cefalosporinas, e polimixina).

A cepa de *P. otitidis* apresentou apenas o gene de resistência *POM-1* e nenhum gene de virulência; o que corrobora com o ensaio *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* realizado, visto que a taxa de sobrevivência foi de 100%.

A cepa de *M. morganii* (SAL.P.POL.3) apresentou genes de resistência à arsênio e mercúrio, enquanto que a amostra de *M. morganii* ATCC 25829 não apresentou resistência aos metais pesados, o que justifica o resultado do teste de tolerância aos metais pesados; onde a amostra SAL.P.POL.3 mostrou uma maior tolerância à arsênio e mercúrio do que a amostra ATCC 25829. As demais tolerâncias aos metais pesados testados (cobre, cromo e prata) foram iguais para ambas as amostras.

De acordo com Chen *et al.* (2012), os genes específicos de virulência para *M. morganii* são *invA*, *tibA*, *mrpA*, *fimH*, *hlyA*, *shlA*, *zapA*, *iutA* e *ireA*. A amostra de *M. morganii* (SAL.P.POL.3) sete destes genes, enquanto que a *M. morganii* ATCC 25829 apresentou os nove genes descritos. A diferença da quantidade de genes pode ser um indicativo da distinção de taxa de sobrevivência por tempo em horas de cada amostra analisada; visto que a ATCC 25829 gerou maior mortalidade. Salienta-se que em um trabalho publicado por Loulou *et al.* (2023) cujo realizaram ensaio *in vivo* com larvas de *G. mellonella*, quando foi utilizada a concentração de 10^{-4} , a taxa de sobrevivência após 72 horas foi de, em média, 70%; demonstrando menor virulência do que as amostras *M. morganii* (SAL.P.POL.3) e *M. morganii* ATCC 25829.

Com a análise filogenômica é possível observar que a cepa *M. morganii* SAL.P.POL.3 tem relação filogenômica com duas bactérias; a BCZU (Cepa NBRC 3848) e CP069157.1 (Cepa DSM 30164); entretanto, a cepa *M. morganii* (SAL.P.POL.3) foi coletada a partir de fragmento muscular de salmão, enquanto as outras duas cepas foram coletadas de fezes humanas. Ainda, a cepa *M. morganii* (SAL.P.POL.3) tem como país de coleta o Brasil e data de coleta o ano de 2022; enquanto que a cepa BCZU (Cepa NBRC 3848) teve como país de coleta o Japão e data de coleta o ano de 2016 e a cepa CP069157.1 (Cepa DSM 30164) teve como país de coleta a Inglaterra e data de coleta o ano de 1905. É possível observar que dentre as amostras coletadas na América Latina, nenhuma tem relação filogenômica com a amostra *M. morganii* (SAL.P.POL.3).

Com o heatmap de genes específicos de virulência de *M. morganii* é pode-se analisar que os genes presentes na amostra *M. morganii* (SAL.P.POL.3) são os mesmos presentes nas amostras com relação filogenômica com a mesma. Ainda, observa-se que os genes *tibA* e *hlyA* são os que menos se fazem presentes nas amostras analisadas, presente apenas em 7,40% e 40,70% respectivamente.

As bactérias apresentam riscos à saúde humana devido a sua capacidade de resistir aos tratamentos, todavia, o grupo de bactérias prejudiciais presentes nos pescados são comuns em diversos estudos. A contaminação de sistemas de produção pesqueira, peixes, meio ambiente, água e alimentos constitui um potencial veículo de infecções. Além disso, o uso indiscriminado e não autorizado de antimicrobianos é um fator agravante na seleção de bactérias resistentes.

A forma mais eficaz de controlar infecções e proliferações é seguir procedimentos de ordem sanitária, assim como manter a qualidade da água, do transporte, do armazenamento e do processamento do pescado. Nessa cadeia, a higiene e a temperatura

de conservação dos alimentos são pontos amplamente discutidos e que devem ser supervisionados com cautela.

5. Conclusão

Baseado nos resultados obtidos torna-se possível concluir que havia presença de bactérias Gram-negativas (enterobactérias e bactérias não fermentadoras de glicose) resistentes à antimicrobianos nos tecidos (filés) de salmão (*Oncorhynchus* sp.), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pangásio (*Pangasianodon* sp.) comercializados para consumo como sashimi, demonstrando a necessidade de melhoria no processo de higienização durante toda a cadeia de produção, visando assim redução dos riscos de contaminação do produto final.

Sugere-se que futuros estudos se concentrem em investigações mais abrangentes, incluindo a identificação de fontes específicas de contaminação ao longo da cadeia de produção, a avaliação do impacto das práticas de cultivo na prevalência de bactérias patogênicas e a implementação de estratégias de controle mais eficazes. Além disso, a realização de estudos epidemiológicos que vinculem a presença dessas bactérias no pescado ao surgimento de doenças em consumidores pode fornecer insights cruciais para orientar políticas de segurança alimentar mais eficientes.

Em face dessas descobertas, é imperativo que a indústria, as autoridades de saúde e os pesquisadores colaborem para desenvolver e implementar medidas preventivas e de controle mais robustas. A segurança alimentar é uma responsabilidade compartilhada, e somente por meio de uma compreensão aprofundada e contínua das ameaças microbiológicas nos alimentos podemos garantir um ambiente mais seguro para os consumidores.

Agradecimentos: F.F. Dominguez agradece o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado, Processo 440026/2023-7.

Financiamento: Este projeto foi financiado pela bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo 440026/2023-7 e pela Universidade de São Paulo (USP).

Declarações de conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse

Referências

1. A.C. Moubareck, D.H. Halat, Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics* 9 (119) (2020) 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>.
2. A. Loulou, M. Mastore, S. Caramella, A.H. Bhat, M.F. Brivio, R.A.R. Machado, S. Kallel. Entomopathogenic potential of bacteria associated with soil-borne nematodes and insect immune responses to their infection. *PLoS One*. (2023) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280675>.
3. A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (268-281) (2012) 3. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
4. B.C.F. Sales, C.P. Silva, M.Z. Laporta, P.R. Siliana. Identificação de enterobactérias em sushi embalados. *Unisanta BioScience*. <https://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/viewFile/2624/1938>, 2021 (Acessado em 23 de novembro de 2022).
5. C.A.V. Álvarez, Resistência antimicrobiana a β -lactâmicos, Colistina e Quinolonas em enterobactérias e *Vibrio* spp. isoladas de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Peniche) (2020).
6. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, thirty-second edition, 2022. ISBN Print: 978-1-68440-134-5. ISBN Eletronic: 978-1-68440-135-2.
7. W.Y. Chen, H.L. Peng, W.C. Shia, F.R. Hsu, C.F. Ken, Y.M. Tsao, C.H. Chen, C.E. Liu, M.F. Hsieh, H.C. Chen, C.Y. Tang, T.H. Ku. Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT pathogenicity-related genes. *BioMed Central* (1-14) (2012).
8. C.T. Berigo, I.B. Toyofuku, M.F.R. Almeida, V.C. Gardin, V.F. Corocher, V.F. Bozzi, D.L.J. Jacomini, Infecções por *Acinetobacter baumannii* em um contexto hospitalar: Revisão literária. *Revista Medicina e Saúde* 4 (9-25) (2021). ISSN: 2595-3516.

9. C.Z. Müller. Determinação da frequência de genes de resistência a quinolonas (qnrA, qnrB e qnrS) em isolados de *E. coli* obtidos em fazendas de suínos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2022).
10. D.J.H. Lintzmaia, I.S. Rebelatto, A.R. Santos, S.B.D. Costa, D.O. Ritter, M. Lanzarin, Emerging bacteria in the nutritional quality of fish. *Brazilian Journal of Development*. 7 (95657-95662) (2021) 10. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n10-063>.
11. E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Oullette, K. Outtersen, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Gayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, WHO Pathogens Priority List Working Group, Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18 (318-327) (2018) 3. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
12. Embrapa. 2016. Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157184/1/BP-126.pdf>. Acesso em 27 de fevereiro de 2024.
13. F.C. Gomes. Detecção de *Staphylococcus sciuri* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase de terminação criadas em tanque rede. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP) (2018).
14. F. Ma, S. Xu, Z. Tang, Z. Li, L. Zhang, Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 3 (32-38) (2021) 1. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>.
15. G.N. Matias, Intoxicação alimentar por histamina associada ao consumo de peixe no Brasil: revisão de literatura. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco (2019).
16. L.J.S. Peixoto, M.C.A. Sá, L.A. Gordiano, M.M. Costa, *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. *Arquivos do Instituto Biológico* 79 (453-461) (2012) 3. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000300020>.
17. M.V. Silva, I.T. Raimundo, M.C. Falcochio, B.M.S. Souza, Dinâmica da carga microbiana de uma unidade de beneficiamento de carne e produtos cárneos. *Ars Veterinaria* 36 (72-7) (2020) 2. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n2p72-77>.
18. Organização Pan-Americana de Saúde, OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos#:~:text=Entre%20elas%2C%20est%C3%A3o%20Acinetobacter%2C%20>

Pseudomonas, da corrente sanguínea e pneumonia., 2017 (Acessado em 18 de abril de 2023).

19. S.M.B. Amaral, A.P.F Almeida, F.S. Silva, Y.Y.V. Silva, M.N. Damaceno, Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. *Revista Científica Multidisciplinar* 2 (211935) (2021) 11. <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i11.935>.
20. T.G. Ribeiro, R. Izdebski, P. Urbanowicz, Y. Carmeli, M. Gniadkowsk, L. Peixe, *Citrobacter telavivum* sp. nov. with chromosomal mcr-9 from hospitalized patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 40 (123-131) (2021). <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04003-6>.
21. Oliveira, S.P. Cibulski, M. Cardoso, In-Depth Genomic Characterization of a Meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas otitidis* Strain Contaminating Chicken Carcass. *Acta Scientiae Veterinariae* 48 (6) (2020) 1743. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.103176>.
22. V.N. Soares, D.M. Viegas, Emergência de Enterobacterias produtoras de metalo-beta-lactamases em um Hospital de Referência para Covid-19. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 54 (188-192) (2022) 2. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202200025>.
23. World Health Organization. Antimicrobial Resistance fact sheets - What is antimicrobial resistance?. <https://www.who.int/features/qa/75/en/>, 2017 (Acessado em 16 de novembro de 2022).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pescado é uma das principais fontes de proteína animal comercializada internacionalmente, sendo uma importante fonte de nutrientes na alimentação humana. Sua contaminação é influenciada pela presença de micro-organismos em sistemas de produção e por falhas procedimentais cometidas na cadeia produtiva. A resistência antimicrobiana é uma preocupação global de saúde pública e o uso indiscriminado e não autorizado de antimicrobianos é um influente agravante na seleção de bactérias resistentes. É possível observar a necessidade de estratégias mais eficazes para mitigar os riscos associados ao consumo desses peixes, especialmente quando preparados de maneiras tradicionais, como sashimi.

A identificação das bactérias encontradas no estudo destaca a diversidade microbiológica presente nos produtos aquáticos destinados à alimentação, tornando imperativo um entendimento mais profundo das fontes de contaminação ao longo da cadeia de produção. A detecção de genes de resistência e virulência, especialmente na bactéria *M. morganii*, sublinha a complexidade dessas cepas e a importância de abordagens multifacetadas para garantir a segurança do consumidor.

A continuidade deste estudo é fundamental, principalmente para garantir a segurança alimentar e promover a saúde pública. Ao abordar a presença de bactérias Gram-negativas em pescado de aquicultura, o trabalho fornece informações para a proteção dos consumidores, visando que os produtos comercializados estejam livres de ameaças microbiológicas significativas. A detecção de bactérias resistentes a antimicrobianos destaca preocupações urgentes relacionadas à saúde, destacando a importância da gestão eficaz de tratamentos antimicrobianos.

As descobertas realizadas têm implicações significativas para políticas regulatórias, incentivando a implementação de padrões mais rigorosos na produção, processamento e comercialização de peixes. Além disso, serve como ponto de partida para pesquisas futuras, inspirando investigações mais aprofundadas sobre fontes específicas de contaminação, desenvolvimento de resistência antimicrobiana e estratégias de controle mais eficazes.

Em um cenário acadêmico, o estudo destaca-se no entendimento da presença de bactérias Gram-negativas em pescado de aquicultura. No âmbito profissional, as implicações são profundas. Os resultados impactam diretamente a indústria alimentícia, sinalizando a necessidade urgente de práticas de produção mais seguras e eficientes.

Profissionais de saúde pública podem utilizar esses achados para desenvolver estratégias mais eficazes na monitorização e prevenção de doenças transmitidas por alimentos relacionadas ao consumo de peixes crus.

As descobertas deste estudo estabelecem uma base sólida para colaborações futuras entre a academia e setores industriais. Portanto, não amplia somente o conhecimento acadêmico, mas também oferece contribuições práticas, influenciando positivamente a segurança alimentar, a saúde pública, práticas sustentáveis na aquicultura e no comércio de peixes.