



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

**Ocorrência de *Salmonella* spp. em tilápia fresca comercializada no Distrito Federal e
avaliação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas isoladas**

ANA CAROLINA ALMEIDA DE OLIVEIRA FERREIRA

Brasília

2021

ANA CAROLINA ALMEIDA DE OLIVEIRA FERREIRA

Ocorrência de *Salmonella* spp. em tilápia fresca comercializada no Distrito Federal e avaliação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas isoladas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Mecanismos Básicos e Processos Biológicos em Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Brasília

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AF383o Almeida de Oliveira Ferreira, Ana Carolina
Ocorrência de Salmonella spp. em tilápia fresca
comercializada no Distrito Federal e avaliação do perfil de
resistência antimicrobiana das cepas isoladas / Ana
Carolina Almeida de Oliveira Ferreira; orientador Daniela
Castilho Orsi. -- Brasília, 2021.
89 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Ciências e Tecnologias em
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Salmonella. 2. Doenças transmitidas por alimentos. 3.
Resistência microbiana a medicamento. 4. Genes de
resistência antimicrobiana. I. Castilho Orsi, Daniela ,
orient. II. Título.

ANA CAROLINA ALMEIDA DE OLIVEIRA FERREIRA

**Ocorrência de *Salmonella* spp. em tilápia fresca comercializada no Distrito Federal e
avaliação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas isoladas**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (Presidente)
Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia

Prof. Dra. Vania Silva Carvalho
Instituto Federal Goiano

Prof. Dra. Cainara Lins Draeger
Faculdade LS

Prof. Dra. Rita de Cássia Coelho de Almeida Akutsu (Suplente)
Universidade de Brasília/Faculdade de Nutrição

Aos meus pais que sempre incentivaram e acreditaram em mim, ao meu esposo por sonhar e participar de todo o processo comigo, à minha filha que deu ainda mais significado a tudo isso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Pai, porque tudo que sou e tenho é graças a Ele, é quem faz muito mais além do que imagino e sonho! Ao meu esposo, Shelton, por ter compartilhado comigo essa jornada, pelo apoio, compreensão e carinho nos momentos em que mais precisei, ter alguém como ele ao meu lado é diferencial. Aos meus pais, Clarícia e Marcondes, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui, são meus incentivos diários e foram fundamentais para essa conquista. À minha linda filhinha, Luísa, que nasceu terminando o prazo do mestrado e me transformou, dando muito mais amor e significado aos meus dias. A toda minha família e amigos que incentivaram e torceram por mim, especialmente a minha irmã, Milena, pela presença e torcida de sempre.

Às minhas professoras que me guiaram de maneira excepcional no mestrado: à minha orientadora Daniela Orsi, que de maneira única me acolheu e ensinou com paciência o universo da microbiologia e controle de qualidade em alimentos, foi essencial para que esse trabalho fosse possível, toda minha gratidão por tornar esse processo muito mais leve; à professora Izabel Cristina, um exemplo de profissional que tem amor e zelo pelo que faz, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e despertar em mim o interesse por seguir no mestrado, minha gratidão pela disponibilidade de sempre.

Às minhas amigas de bancada: Sabrina, por dividir a pesquisa comigo, nos bons e maus momentos, por ser meu apoio quando precisava, oferecendo sempre o seu melhor; Letícia, por estar sempre presente e disposta em tudo, seja buscando um banner, fazendo os meios de cultura ou dividindo os minicursos. Aos pesquisadores e técnicos do laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE) e Patologia Molecular – FCE pelo apoio, troca de saberes e conhecimento adquirido.

À Universidade de Brasília, pelo ensino de qualidade durante os anos da graduação e a oportunidade de vivenciar isso também na Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para nível mestrado. À FAPDF – Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal por ter me concedido o apoio à participação em evento para apresentação de trabalho em Maceió - AL. À banca examinadora pela disposição em participar na contribuição para o crescimento deste trabalho.

“porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são
todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.”

(Romanos 11:36)

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1. PRODUÇÃO DE TILÁPIA NO BRASIL.....	18
1.2. OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS <i>SALMONELLA</i> SPP. NA TILÁPIA	20
1.3. CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i> SPP.	21
1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA E MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i> SPP.....	24
1.5. DOENÇAS CAUSADAS PELAS BACTÉRIAS <i>SALMONELLA</i> SPP. E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	26
1.6. BACTÉRIAS <i>SALMONELLA</i> SPP. E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS 28	
1.7. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	31
1.7.1 Resistência aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos	32
1.7.2 Resistência aos antimicrobianos da classe das tetraciclinas	34
1.7.3 Resistência aos antimicrobianos da classe das sulfonamidas	35
1.7.4 Resistência aos antimicrobianos da classe dos fenicóis	36
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. METODOLOGIA	38
3.1. COLETA, PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	38
3.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS BACTÉRIAS <i>SALMONELLA</i> SPP. ISOLADAS	39
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES ..	40
3.4. ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	40
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	70
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO.....	76
ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO	88

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade dos reagentes utilizados na identificação dos genes <i>invA</i> , <i>blaCTX</i> , <i>tetB</i> , <i>sul2</i> e <i>floR</i>	41
Tabela 2. Sequência dos primers, tamanho dos produtos amplificados e condições de termociclagem na PCR para identificação dos genes <i>invA</i> , <i>blaCTX</i> , <i>tetB</i> , <i>sul2</i> e <i>floR</i>	42
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>Salmonella</i> spp. isoladas das amostras de filé de tilápia fresca.....	44
Tabela 4. Resistência antimicrobiana e resistência a múltiplas drogas (MDR) dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	46
Tabela 5. Perfil de resistência antimicrobiana das bactérias <i>Salmonella</i> spp. isoladas das amostras de filé de tilápia fresca.....	47
Tabela 6. Presença dos genes de resistência antimicrobiana nos 57 isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	48
Tabela 7. Perfis de genes de resistência nas cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas das amostras de filé tilápia fresca.....	50

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), principal espécie cultivada no Brasil.....	18
Figura 2. Enterobactéria <i>Salmonella</i> spp.....	22
Figura 3. Salmonelose: Invasão do epitélio intestinal.....	25
Figura 4. Mecanismos de transferência genética bacteriana. A: Transformação. B: Transdução C: Conjugação (n)	31

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Participação das principais espécies da piscicultura brasileira no ano de 2018.....	19
Gráfico 2. Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de filé de tilápia, confirmada pela detecção de gene de virulência <i>InvA</i>	42
Gráfico 3. Porcentagem de resistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de tilápia fresca	44
Gráfico 4. Relação entre a presença dos genes de resistência e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	48

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA	70
ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO	76
ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO.....	88

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitros
µm	Micrómetro
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aw	Atividade de água
CAT	Enzima cloranfenicol acetiltransferase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DHPS	Diidropteroato-sintase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
Emater	Empresa de assistência técnica e extensão rural do Distrito Federal
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
FA	Ágar Fenilalanina
g	Gramma
kb	Kilobase
LB	Caldo Lúria Bertani
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidrug-resistant (multirresistente)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
p/v	Peso/Volume
pb	Pares de Base
PCR	Reação da Cadeia em Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
SPI	Ilhas de Patogenicidade da <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella</i> Patogenicity Island)

spv	Virulência do plasmídeo <i>Salmonella</i>
SS	Ágar Salmonella-Shigella
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
W	Watt
XLD	Xilose-lisina-desoxicolato

RESUMO

A tilápia é o peixe de água doce mais cultivado no Brasil e suas características como elevado valor nutricional, ausência de micro espinhas e sabor suave tornam-no um dos peixes mais apreciados no mercado consumidor. No entanto, esse alimento é extremamente perecível e sujeito à contaminação bacteriana. A ocorrência de bactérias *Salmonella* spp. em peixes está comumente relacionada ao ambiente de piscicultura, bem como, ao ambiente de industrialização, devido a práticas de higiene deficientes. *Salmonella* spp. se destaca como uma das principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar e está associada à resistência a diversos antimicrobianos, incluindo importantes medicamentos usados na terapia humana. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de filé de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal, e determinar o perfil de resistência antimicrobiana das cepas isoladas. Assim, foram coletadas, em diferentes supermercados do Distrito Federal, 101 amostras de filé de tilápia fresca. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foram realizadas as análises microbiológicas com uso dos meios de cultivo Ágar Salmonella Shigella e/ou Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, Ágar Três Açúcares e Ferro, Agar Lisina-Ferro e Agar Fenilalanina. As cepas isoladas foram submetidas à identificação molecular pela técnica de PCR para detecção do gene de virulência *invA*. Posteriormente, a avaliação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. foi realizada por meio da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer, e os genes de resistência *blaCTX*, *sul2*, *tetB* e *floR* foram pesquisados em todos os isolados. Os resultados mostraram que 45,5% (46/101) das amostras de tilápia fresca apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., confirmadas pela detecção do gene *invA*. O perfil de resistência antimicrobiana mostrou altas taxas de resistência para amoxicilina/ácido clavulânico (87,7%), tetraciclina (82,5%), sulfonamida (57,9%) e cloranfenicol (26,3%) nas 57 cepas de *Salmonella* spp. isoladas, sendo que 56,1% das cepas foram multirresistentes. O gene de resistência a beta-lactamases *blaCTX* foi identificado em 64,9% dos isolados, o gene de resistência à tetraciclina *tetB* foi identificado em 54,4% dos isolados, o gene de resistência ao cloranfenicol *floR* foi identificado em 50,9% dos isolados, enquanto o gene de resistência à sulfonamida *sul2* esteve presente em 49,1% dos isolados. Os resultados desse estudo mostraram uma elevada contaminação por *Salmonella* spp. em amostras de filé de tilápia comercializadas no Distrito Federal, o que torna este alimento um possível risco à saúde do consumidor. A elevada positividade de cepas de *Salmonella* spp. multidroga resistente associada à elevada presença de genes de resistência nas amostras de tilápia

demonstra o potencial desses peixes contaminados servirem como meio de transmissão de *Salmonella* spp. para os humanos e fonte para disseminação de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: *Salmonella*; filé de tilápia; doenças transmitidas por alimentos; resistência microbiana a medicamentos; genes de resistência antimicrobiana; *blaCTX*; *tetB*; *sul2*; *floR*.

ABSTRACT

Tilapia is the most cultivated freshwater fish in Brazil, and its characteristics such as high nutritional value, absence of micro bones and mild flavor make it one of the most appreciated fish in the consumer market. However, this food is extremely perishable and subject to bacterial contamination. The occurrence of *Salmonella* spp. in fish it is commonly related to the psyculture environment, as well as the industrialization environment, due to poor hygiene practices. *Salmonella* spp. stands out as one of the main bacteria causing foodborne illnesses, and is associated with resistance to several antimicrobials, including important drugs used in human therapy. The aim of this study was to investigate the presence of *Salmonella* spp. in fresh tilapia fillet samples commercialized in the Federal District, and to determine the antimicrobial resistance profile of the isolated strains. Thus, 101 samples of fresh tilapia fillet were collected in different supermarkets in the Federal District. For the search for *Salmonella* spp. microbiological analyzes were performed using the culture media Salmonella Shigella Agar and/or Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Three Sugars and Iron Agar, Lysine-Iron Agar and Phenylalanine Agar. The isolated strains were submitted to molecular identification using the PCR technique to detect the *invA* virulence gene. Subsequently, the evaluation of the antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. was performed using the Kirby-Bauer disk-diffusion technique, and the resistance genes *blaCTX*, *sul2*, *tetB* and *floR* were searched for in all strains. The results showed that 45.5% (46/101) of fresh tilapia samples were contaminated by *Salmonella* spp., confirmed by the detection of the *invA* gene. The antimicrobial resistance profile shows high rates of resistance to amoxicillin/clavulanic acid (87.7%), tetracycline (82.5%), sulfonamide (57.9%) and chloramphenicol (26.3%) in the 57 strains of *Salmonella* spp. isolated, and 56.1% of the strains were multiresistant. The beta-lactamase resistant gene *blaCTX* was identified in 64.9% of the strains, the tetracycline resistance gene *tetB* was identified in 54.4% of the strains, the chloramphenicol resistance gene *floR* was identified in 50.9% of the strains, while the sulfonamide resistance gene *sul2* was present in 49.1% of the strains. The results of this study showed a high contamination by *Salmonella* spp. in samples of tilapia fillet sold in the Federal District, which makes this food a possible risk to consumer health. The high positivity of resistant *Salmonella* spp. multidrug associated with the high presence of resistance genes in tilapia samples demonstrates the potential of these contaminated fish to serve as a means of transmission of *Salmonella* spp. for humans and a source for spreading antimicrobial resistance.

Keywords: *Salmonella*; tilapia fillets; freshwater fish; foodborne illnesses; microbial drug resistance; antimicrobial resistance genes; *blaCTX*; *tetB*; *sul2*; *floR*.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. PRODUÇÃO DE TILÁPIA NO BRASIL

A tilápia é a espécie de peixe de água doce mais cultivada no mundo e uma fonte sustentável de alimento. Essa espécie de peixe é nativa da África e Palestina e inclui os gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (CANONICO *et al.*, 2005; CARDOSO, 2016). É considerada um dos pescados com maior aceitação no mercado consumidor pelas suas características atrativas, tais como carne branca, sabor suave e ausência de espinhos em forma de “y”. Além disso, a tilápia é um peixe de fácil filetagem e possui rendimento alto do filé, com valores próximos a 40% (SCHULTER; FILHO, 2017). No estudo do Silva *et al.*, (2009) exemplares de tilápia com peso médio de 450 a 500 g tiveram um rendimento do filé médio de 59,1%, tornando esse pescado ideal para a industrialização.

Em 1953, introduziu-se a tilápia do Congo (*Tilapia rendalli*) no Brasil, seguidas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da tilápia Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*) que foram introduzidas em 1971 no nordeste brasileiro pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (IGARASHI, 2019; SCHULTER; FILHO, 2017). A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) é a segunda espécie mais cultivada no mundo e a primeira no Brasil, podendo alcançar até 5 kg e é descrita como a mais utilizada nos criatórios devido à sua característica de rápido crescimento e ganho de peso, além de possuir carne de qualidade superior com poucas espinhas (SCHULTER; FILHO, 2017).

Figura 1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), principal espécie cultivada no Brasil

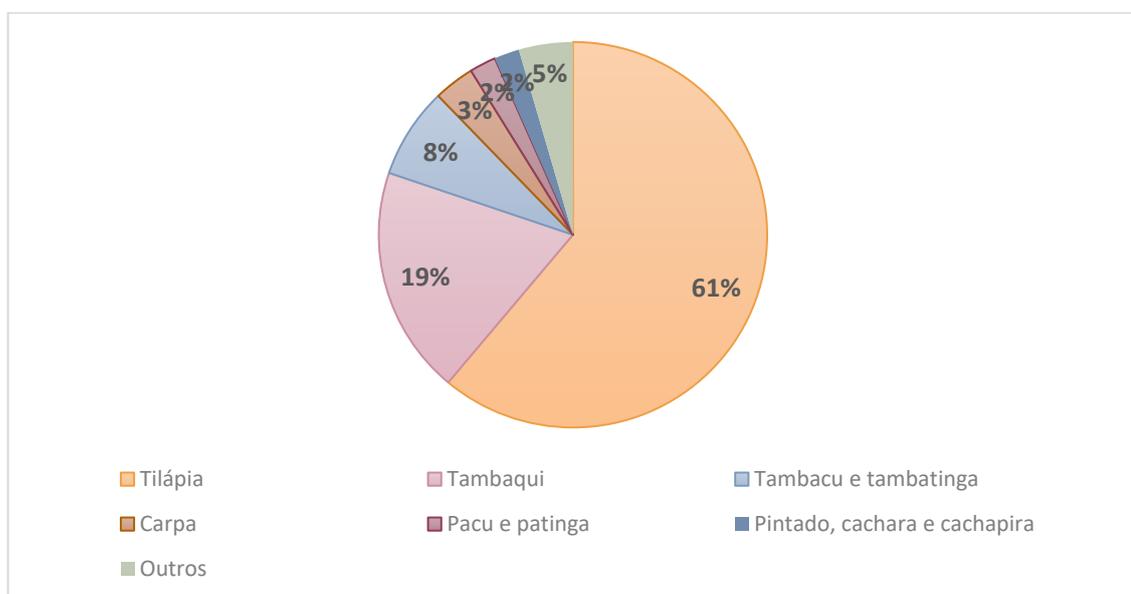


Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2015). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2138001/tilapia-em-laboratorio>> Foto: Gabriel Pupo Nogueira.

A produção de tilápia é caracterizada pela facilidade singular de manutenção do ambiente de cultivo. Entre as várias espécies de peixes a serem criadas no sistema de confinamento, cada uma possui características próprias de adaptação, o que leva os produtores a estabelecerem preferências de acordo com a região e as condições de cultivo. Contudo entre as diversas espécies de peixes, a tilápia apresenta boa adaptação a distintas regiões climáticas e diferentes sistemas de cultivo, associado ao crescimento rápido de sua espécie (MILANEZ *et al.*, 2019)

No Brasil, entre as diversas espécies de peixes produzidas, a tilápia é a que atualmente se encontra em maior estágio de desenvolvimento liderando a produção brasileira de carne de peixe e colocando o Brasil entre os cinco maiores produtores mundiais de tilápia (MILANEZ *et al.*, 2019). Como se pode observar no Gráfico 1, a tilápia destaca-se como a principal espécie de peixe produzida na piscicultura brasileira (produção de 323,7 mil toneladas no ano de 2019), um aumento de 3,5% em relação ao ano anterior (produção de 311,5 mil toneladas no ano 2018), correspondendo a 61% da produção nacional de peixes, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018; IBGE, 2019). Quanto à distribuição geográfica, o Paraná foi o maior estado produtor em 2019, seguido por São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2019). Atualmente, os principais polos brasileiros produtores de tilápia estão localizados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, porém existem também, com menor volume de produção, polos localizados na região Centro Oeste (MILANEZ *et al.*, 2019).

Gráfico 1. Participação das principais espécies da piscicultura brasileira no ano de 2019



Fonte: Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal (IBGE, 2019).

No Centro Oeste brasileiro a participação dos estados na produção de tilápia no Brasil no ano de 2019 correspondeu a 5,27% (17.059 mil toneladas) em Mato Grosso do Sul, 2,84% (9.186 mil toneladas) em Goiás, 0,75% (2.413 mil toneladas) em Mato Grosso e 0,46% (1.472 toneladas) no Distrito Federal. Segundo a EMATER-DF, constata-se uma evolução expressiva na demanda de pescado em Brasília, apontando para um consumo anual acima de 14 kg per capita, o que mostra que a região tem um consumo de peixes maior que a média brasileira. A principal espécie criada no Distrito Federal é a tilápia, seguida do tambaqui e seus híbridos. Atualmente, a produção local é consumida no próprio estado, mas ela responde com menos de 15% do volume total de peixe de água doce consumido, sendo assim o Distrito Federal importa a maior parte do pescado de outras regiões (BRASIL, 2020a; BORGES; BERTHIER, 2019).

Além da facilidade de cultivo da tilápia, o Brasil possui um clima tropical na maior parte de seu território que permite a produção do peixe durante o ano todo, além de ser um grande produtor de grãos como soja e milho, que são a base da ração desses peixes (IGARASHI, 2019). No Brasil há grandes reservatórios aquáticos para o cultivo em tanques-rede de alta densidade. Até o final da década de 1990, a tilapicultura brasileira seguia um modelo semi-intensivo, desenvolvida em tradicionais viveiros escavados, tanques de terra e em reservatórios. A partir do ano 2000, a produção passou progressivamente para criação mais intensiva em tanques-rede, sobretudo em águas da União (nos grandes reservatórios das hidrelétricas) (SCHULTER; FILHO, 2017; SUSSEL, 2013).

1.2. OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS *SALMONELLA* SPP. NA TILÁPIA

A qualidade do pescado é, em grande parte, determinada pelo grau de frescor e existe uma preocupação quanto a esse requisito. Naturalmente, o pescado é um alimento mais perecível em comparação a outros alimentos de origem animal, devido não somente às suas características intrínsecas, mas também ao habitat natural em que vive. Sendo assim, a carne de peixe é susceptível à deterioração autolítica, oxidativa e microbiológica, devido à alta atividade de água, elevado teor de gorduras insaturadas e pH próximo à neutralidade e, portanto, pode ser contaminada por um variado grupo de microrganismos, incluindo a *Salmonella* spp. que tem seu pH ótimo de crescimento entre 6,7 - 7,5 (DANTAS FILHO *et al.*, 2020; SOARES; GONÇALVES, 2011).

A *Salmonella* spp. não pertence à microbiota dos pescados, porém a ocorrência dessas bactérias em peixes está comumente relacionada ao ambiente de criação, bem como, ao ambiente de industrialização, devido a práticas de higiene deficientes (FERNANDES *et al.*,

2018; SANTOS, 2015). Na piscicultura, o uso de camas de frango como adubo orgânico para fertilização dos tanques de piscicultura (DANTAS FILHO *et al.*, 2020; ESPOSTO *et al.*, 2007), práticas inadequadas como tanques superlotados, fatores de estresse dos peixes e dietas desequilibradas podem aumentar a susceptibilidade dos peixes a patógenos e diversas doenças (AMAGLIANI *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2018). Ingredientes ou matérias primas das rações utilizadas na alimentação dos peixes também representam uma fonte de contaminação de *Salmonella* na produção da aquicultura, influenciando na microbiota do peixe (LUNESTAD *et al.*, 2007).

Estudos observaram que a ocorrência de *Salmonella* spp. no ambiente aquático está geralmente associada à contaminação fecal através de esgoto urbano e esterco de animais, onde a falta de saneamento correto para os rejeitos de animais e humanos contribuem para a poluição desse ambiente (BANIGA *et al.*, 2019; KOONSE *et al.*, 2005; TRAORÉ *et al.*, 2015). A contaminação pode ocorrer por processos de lixiviação que carregam os contaminantes do solo durante as estações chuvosas, como a exemplo de fezes de animais criação e domésticos, que circulam na proximidade (SANTOS, 2015). Além disso, a contaminação do pescado também pode ocorrer na etapa pós-captura através da contaminação cruzada durante transporte, armazenamento ou manuseio inadequado, como por exemplo, na evisceração e filetagem e também através do contato com o gelo usado para conservação (FERNANDES *et al.*, 2018; DANTAS FILHO *et al.*, 2020).

Alguns estudos, em diferentes regiões do mundo, têm relatado a presença de *Salmonella* spp. em amostras de tilápia, causando preocupação com a saúde pública, pois este alimento pode se tornar um risco para a saúde do consumidor (AWUOR; MIRUKA; ELIUD, 2011; BEKELE; WORKAGEGN; NATARAJAN, 2019; ESPOSTO *et al.*, 2007).

1.3. CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *SALMONELLA* SPP.

As bactérias do gênero *Salmonella* são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, variando em diâmetro de 0,7 a 1,5 μm e em comprimento de 2 a 5 μm . A maioria das bactérias *Salmonella* spp. são móveis por flagelos peritríquios (Figura 2) (JAJERE, 2019; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). A maioria dos sorotipos produz sulfeto de hidrogênio, a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase e não fermentam lactose, contudo, muitas cepas podem adquirir essa característica por meio de transferência plasmidial (BRASIL, 2011).

Bioquimicamente, as bactérias *Salmonella* spp. são oxidase negativa; catalase positiva; indol negativa, Voges-Proskauer negativa, Vermelho de Metila negativa, malonato negativa e ureia negativa. Também são capazes de formar ácido e, na maioria das vezes, gás a partir da glicose, com exceção de *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* ($\leq 5\%$ produzem gás). Além da glicose, fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol (BRASIL, 2011).

Figura 2. Enterobactéria *Salmonella* spp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2019). Ilustrador: James Archer

As bactérias *Salmonella* spp. apresentam ainda como características metabólicas a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e utilização do citrato como única fonte de carbono, podendo ocorrer variações em função do sorotipo ou da subespécie (BRASIL, 2011). Estas propriedades são usadas para o desenvolvimento de vários meios seletivos e diferenciais para a cultura, isolamento e identificação presuntiva das bactérias *Salmonella* spp. O isolamento de *Salmonella* em alimentos e outras amostras ambientais, usualmente, utiliza métodos de cultura que envolvem várias etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e crescimento em meios seletivos e diferenciais (JAJERE, 2019).

As bactérias *Salmonella* spp. são mesófilas, assim, sua temperatura para crescimento envolve a faixa de 32 a 43°C, apresentando melhor desenvolvimento em 37°C e extremos variando de 5 a 46°C. São bactérias sensíveis a altas temperaturas, não sobrevivendo à temperatura de cozimento superior a 70°C (BRASIL, 2011; JAJERE, 2019). O pH ótimo para

seu crescimento é entre 6,5 e 7,5, mas podendo sobreviver a extremos variando de 3,8 a 9,5 (RODRIGUES, 2017). Outro fator que também influencia seu crescimento é uma necessidade de alta atividade de água (a_w) entre 0,94 e 0,99 (água pura $a_w = 1,0$) para o seu desenvolvimento (PUI *et al.*, 2011).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* atualmente divide o gênero em espécies, subespécies e sorotipos ou sorovares. A classificação em sorotipos de *Salmonella* foi baseada no conceito inicial proposto por White-Kaufmann-Le Minor, com base na identificação sorológica dos antígenos O (somático), H (flagelar) e Vi (capsular) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Cada sorotipo foi considerado uma espécie separada, no entanto, métodos moleculares mostraram que a maioria das espécies *Salmonella* pertencia à única espécie de *S. enterica*, com exceção da *S. bongori* (BRENNER *et al.*, 2000; GRIMONT; WEILL, 2007).

Portanto, atualmente, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. E a espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*; *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtanae* e *S. enterica* subespécie *indica* (BRENNER *et al.*, 2000; GRIMONT; WEILL, 2007). Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. Existem atualmente mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella*, entre os quais, a espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e 1.547 pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Na prática, o nome da subespécie geralmente não é mencionado, por exemplo, na espécie *S. enterica* subespécie *enterica* o sorotipo Typhi é normalmente reduzido para *S. Typhi*. Na nomenclatura atual, os sorotipos não indicam uma espécie, motivo pelo qual o nome não deve ser escrito em itálico (BRASIL, 2011).

Entre as subespécies capazes de infectarem os seres humanos e causar doenças, os sorotipos da espécie *S. enterica* subespécie *enterica* são encontrados predominantemente em animais de sangue e representam mais de 99% dos isolados clínicos, enquanto as demais subespécies e *S. bongori* são isoladas principalmente de animais de sangue frio e representam menos de 1% dos isolados clínicos (JAJERE, 2019; PUI *et al.*, 2011).

O gênero *Salmonella* inclui vários sorotipos de importância clínica associados à infecção humana, que são divididos em dois grupos de acordo com a patologia causada: febre entérica tifoide e paratifoide (*S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C) e gastroenterites (principalmente *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Choleraesuis*). O sorotipo mais virulento de *Salmonella*, *S. Typhi*, restrito especificamente a seres humanos, causa a doença bacteriana

conhecida como febre tifoide. Enquanto a *S. Typhimurium* pode colonizar um amplo espectro de hospedeiros, sendo uma das principais envolvidas nas gastroenterites (SABBAGH *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2017).

1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA E MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO GÊNERO *SALMONELLA* SPP.

A infecção por *Salmonella* spp. geralmente acontece pela ingestão oral de alimentos ou água contaminados e as bactérias têm a capacidade de atravessar a barreira ácida do estômago e sobreviver às altas concentrações de sais biliares do trato gastrointestinal. O processo infeccioso acontece pela adesão das bactérias *Salmonella* spp. à superfície das células do epitélio intestinal do hospedeiro, seguida de invasão e colonização dessas. Com isso as bactérias induzem a expressão e a regulação de várias citocinas pró-inflamatórias no epitélio intestinal, iniciando o processo inflamatório (CHAKROUN *et al.*, 2017; MENDONÇA, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A patogenicidade das bactérias *Salmonella* spp. é influenciada por vários fatores de virulência. As maiorias dos genes de virulência dos microrganismos podem estar presentes em regiões específicas do cromossomo dos microrganismos, chamadas de ilhas da patogenicidade, comuns em sorotipos patogênicos de determinadas espécies (KADHIM, 2020; VIEIRA, 2009). Acredita-se que esses grupos de genes foram adquiridos por *Salmonella* de outras espécies através da transferência horizontal de genes (ASTEN; DIJK, 2005). Essas ilhas da patogenicidade são segmentos relativamente grandes de DNA (entre 10.000 a 200.000 pares de bases), que possuem informações codificadas para a construção de fatores de virulência, como invasinas, adesinas, toxinas e componentes que possibilitem a ação desses fatores (VIEIRA, 2009).

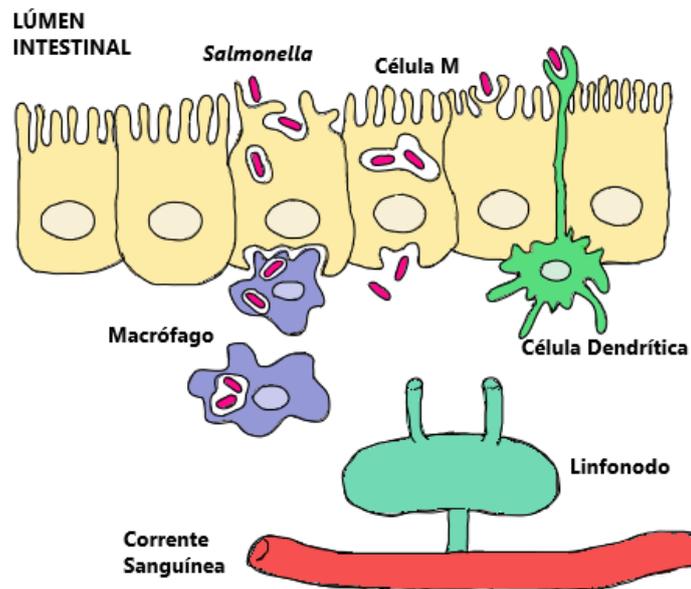
Dentre as ilhas de patogenicidade das bactérias *Salmonella* spp., as regiões SPI-1 e SPI-2 são as mais estudadas. Os genes codificados por SPI-1 são necessários para a invasão de células hospedeiras e expressão de uma série de proteínas para o sistema de secreção. A respeito disso, os genes *inv*, presentes na região SPI-1, desempenham uma importante função na internalização bacteriana, que compreende um complexo de exportação de proteínas segregadas (o sistema de secreção do tipo III), uma estrutura presente na membrana bacteriana capaz de transferir proteínas efetoras para a célula hospedeira, que uma vez dentro da célula intestinal interagem com domínios de proteínas e causam modificações no citoesqueleto, permitindo a invasão da célula epitelial. Enquanto os genes codificados por SPI-2, como *ssaR* e *ssrA*

permitem que a *Salmonella* sobreviva e se multiplique no interior das células hospedeiras, especialmente macrófagos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; VIEIRA, 2009).

Além do DNA cromossômico, os elementos genéticos transmissíveis também podem abrigar genes de virulência. As bactérias *Salmonella* podem possuir nos plasmídeos uma região genômica de 7,8 kb, denominada spv (virulência do plasmídeo *Salmonella*) que é capaz de conferir o fenótipo virulento à *Salmonella*. Esse locus abriga cinco genes designados spv R, A, B, C e D. A expressão dos genes spv desempenham um importante papel na multiplicação intracelular no sistema retículo-endotelial de animais de sangue quente, além de auxiliar na sua replicação em locais extraintestinais, incluindo células hepáticas e do baço (FARDSANEI *et al.*, 2017; JAJERE, 2019).

A infecção por *Salmonella* se inicia na mucosa do intestino delgado e cólon, no qual elas aderem ao epitélio por meio de suas fímbrias. Na maioria dos casos a infecção permanece localizada, dando origem a uma gastroenterite que se restringe à mucosa intestinal, com o aumento da secreção de água e eletrólitos e raramente ocorre septicemia. Entretanto, dependendo da virulência do sorotipo envolvido e da resposta imunológica do hospedeiro, o quadro pode generalizar-se. Ocasionalmente, as bactérias *Salmonella* spp. conseguem atravessar a mucosa intestinal através das células M das microvilosidades intestinais e após a penetração da mucosa intestinal, o patógeno se multiplica e pode invadir fagócitos, ativando mecanismos de virulência que permitem sua sobrevivência e replicação, podendo penetrar no sistema linfático e na corrente sanguínea (Figura 3) (FERNANDES *et al.*, 2018; TORTORA *et al.*, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). A migração para órgãos leva a forma de doença sistêmica em animais e seres humanos susceptíveis, como a febre tifoide e as febres paratifoideas (MENDONÇA, 2016; OHL; MILLER, 2001).

Figura 3. Salmonelose: Invasão do epitélio intestinal



Fonte: Própria autora (2020)

1.5. DOENÇAS CAUSADAS PELAS BACTÉRIAS *SALMONELLA* SPP. E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

A salmonelose destaca-se no campo da saúde pública como uma das principais doenças transmitidas por alimentos no Brasil e no mundo e seu controle representa um desafio para a saúde pública. Apesar do desenvolvimento tecnológico e educação sanitária como prática de prevenção de doenças na população, é crescente e relevante o número de casos de salmonelose humana e animal (BRASIL, 2011; SHINOHARA *et al.*, 2008). O último levantamento de dados do Ministério da Saúde mostra que nos últimos nove anos, a *Salmonella* spp. é o segundo agente etiológico mais frequente identificado em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, representando 11,2% dos surtos notificados (DRAEGER *et al.*, 2019). No continente europeu, a salmonelose também é a segunda doença transmitida por alimentos mais comum e observou-se a ocorrência de salmonelose causada por *S. Enteritidis* em vários países da Europa (EFSA, 2017).

As salmoneloses causam infecções gastrointestinais (enterocolites), caracterizadas por uma infecção aguda da mucosa intestinal, provocada por infiltração e transmigração epitelial de neutrófilos, exsudação de líquido seroso e diarreia. Os principais sintomas incluem: febre (38-39°C) normalmente de curta duração (dois dias), cólicas abdominais, dor de cabeça e

calafrios. O período de incubação é em média de 48 h, mas o quadro infeccioso começa a regridir, usualmente, após três a quatro dias (BRASIL, 2011; TRABULSI E ALTERTHUM, 2015). Os sorotipos de *Salmonella* causadores de salmonelose são isolados predominantemente em animais de produção e encontrados no intestino de aves, suínos e bovinos (MENDONÇA, 2016). Assim, os principais veículos de transmissão incluem os alimentos de origem animal como a carne de vaca, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos oriundos de leite não pasteurizados, com destaque principalmente para aves e ovos. A incidência de salmonelose, além da relação com a contaminação de água e alimentos com material fecal, também está relacionada a más condições na manipulação dos alimentos (SHINOHARA *et al.*, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; ZHU *et al.*, 2017).

Nos casos das febres entéricas (febre tifoide e paratifoide), causadas pela *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* e *C*, as manifestações clínicas estão associadas à febre alta de 40°C e cefaleia contínua. A *Salmonella*, em vez de ser destruída pelas células fagocíticas, multiplica-se no interior delas e se dissemina para múltiplos órgãos, sobretudo baço e fígado. Com a disseminação sistêmica, pela sua liberação na corrente sanguínea, sintomas inespecíficos, tais como, calafrios, diaforese, tontura, anorexia, tosse, fraqueza, dor de garganta e dores musculares podem ocorrer (TORTORA *et al.*, 2017). A falta de saneamento desempenha um papel importante na disseminação da febre tifoide. A incidência de febre tifoide é rara nos países desenvolvidos, no entanto, nos países endêmicos ocorre alta incidência de febre tifoide, resultante da contaminação de alimentos e água com esgoto (KADHIM, 2020).

Neste contexto em que as bactérias *Salmonella* spp. frequentemente contaminam o ambiente e os alimentos e a sua evidente importância nas doenças transmitidas por alimentos em saúde pública. A legislação brasileira não permite a ocorrência de bactérias *Salmonella* spp. em alimentos de origem animal como carne bovina, suína, aves e pescado (o resultado das análises deve ser expresso como ausência em 25 g) e sua presença nesses alimentos os torna impróprios para o consumo e pode representar um risco para a saúde dos consumidores (BRASIL, 2019). No código de prática para peixes e produtos de pesca, a Codex Alimentarius orienta manter os peixes em baixas temperaturas, evitando a contaminação cruzada no pós-processamento (WHO, 2020).

1.6. BACTÉRIAS *SALMONELLA* SPP. E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Um dos avanços da medicina moderna foi o desenvolvimento de agentes antimicrobianos, todavia, o progressivo desenvolvimento de resistência antimicrobiana tem reduzido a eficácia desses agentes (FAIR; TOR, 2014). A resistência antimicrobiana pode agravar a doença causada pelo microrganismo no indivíduo infectado, devido a uma variedade de mecanismos, como o aumento da frequência, duração e severidade da infecção, no qual as próprias bactérias comensais podem funcionar como um reservatório de genes de resistência que podem transferir a sua resistência às bactérias patogênicas (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

Por vários anos a ampicilina, o cloranfenicol e o trimetoprim-sulfametoxazol foram antimicrobianos de escolha para o tratamento de salmonelose, porém a resistência a esses fármacos aumentou consideravelmente. Dessa forma, as opções recomendadas de tratamento de casos severos de salmonelose humana passaram a incluir fluoroquinolonas (ciprofloxacino) e cefalosporinas de espectro estendido (PARRY; THRELFALL, 2008). A resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos teve um aumento de 17% na década de 1970 para 31% ao final dos anos 1980 (BRASIL, 2011). E recentemente um potencial problema é o aumento mundial de fenótipos multirresistentes entre os sorotipos de *Salmonella*, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, especialmente com resistência a quinolonas, fluoroquinolonas e cefalosporinas (FERNANDES *et al.*, 2018)

Diante desse cenário mundial, em 2015, a Organização Mundial de Saúde lançou o Plano de Ação Global de Resistência a Antimicrobianos. O objetivo desse projeto foi garantir, pelo maior tempo possível, a continuidade do sucesso do tratamento de doenças infecciosas com medicamentos eficazes, de qualidade e seguros, utilizados de forma responsável e acessível (WHO, 2015). Com essa perspectiva, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, que define estratégias nacionais para detecção, prevenção e redução da Resistência Microbiana nos serviços de saúde (ANVISA, 2017) e o Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos, que norteia a atuação da Agência frente a esse urgente desafio da saúde pública (ANVISA, 2018).

Os antimicrobianos são amplamente usados na medicina humana e também na medicina veterinária (para usos terapêuticos e promoção do crescimento de animais de criação) (XIE *et al.*, 2020). Uma das preocupações de saúde pública é que os resíduos de antimicrobianos podem

permanecer nos alimentos de origem animal (RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018). A exposição a resíduos de antimicrobianos pode levar ao aparecimento de resistência em ambas as bactérias comensais do intestino humano e dos animais, o que ocasiona a possível disseminação de genes de resistência a várias populações bacterianas, além de causar alergias difíceis de diagnosticar (FERNANDES *et al.*, 2018; GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

Dentre as bactérias responsáveis por zoonoses e patogenicidade ao homem, temos as do gênero *Salmonella* (LIMA *et al.*, 2018). Neste contexto, é consenso que o uso extensivo e irracional de antimicrobianos na medicina veterinária favoreceu o desenvolvimento de resistência intrínseca ou adquirida das bactérias do gênero *Salmonella* e tal situação foi agravada pela ampla utilização por vários anos de antimicrobianos em subdoses nas rações animais, principalmente como melhoradores de desempenho (ANTUNES *et al.*, 2016; FAIR; TOR, 2014; HELKE *et al.*, 2017; RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018).

A possibilidade de haver uma resistência aos antimicrobianos transferível por meio dos alimentos, fez com que o Brasil, através Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e baseado nas recomendações das organizações internacionais de referência para ao uso racional de antimicrobianos em animais, venha continuamente proibindo o uso de diversos antimicrobianos com finalidade de aditivo melhorador de desempenho. Desta forma, foram proibidas no Brasil, desde 1998 até 2016, as classes e/ou substâncias antimicrobianas para uso como aditivos melhoradores de desempenho: avoparcina (1998); cloranfenicol e nitrofuranos (2003); anfenicóis, tetraciclinas, beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (2009); eritromicina e espiramicina (2012) e, mais recentemente, a colistina (2016) (BRASIL, 2017). Neste sentido, continuamente o MAPA reavalia o uso de substâncias como aditivos melhoradores de desempenho e recentemente foi proibido o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana (BRASIL, 2020b).

No Brasil, existem relativamente poucos dados epidemiológicos sobre perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de animais de criação. Um relatório elaborado pela Anvisa (2012) conduzido em 14 estados brasileiros (incluindo o Distrito Federal) relatou que 76,8% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango foram resistentes a um ou mais antimicrobianos. Os maiores percentuais de resistência encontrados foram para os antimicrobianos: estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%) e ácido nalidíxico (44,0%).

No estudo de Cohen *et al.* (2020), foi avaliado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de 188 cepas de *Salmonella* isoladas de frango em Israel e os resultados

mostraram que 60% das cepas (113/188) foram multirresistentes, apresentando resistência a três ou mais compostos antimicrobianos de classes diferentes. Os maiores percentuais de resistência encontrados foram para os antimicrobianos: ácido nalidíxico (65%), tetraciclina (65%) e estreptomicina (48%).

Yang *et al.* (2015) avaliaram a prevalência de *Salmonella* spp. em 554 amostras de diferentes pescados (incluindo peixes de água doce e peixes de água salgada) e frutos do mar provenientes de mercados públicos na China e também determinaram o perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas dessas amostras. Do total de 554 amostras de pescados e frutos do mar, 86 amostras (15,5%) foram positivas para *Salmonella* spp.. Das 103 cepas de *Salmonella* spp. isoladas, 66% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 34% foram multirresistentes (resistentes três ou mais antimicrobianos). As cepas testadas mostraram maior resistência aos antimicrobianos: tetraciclina (35,9%), ampicilina (28,2%), ácido nalidíxico (26,2%), trimetoprim-sulfametoxazol (25,2%), cloranfenicol (20,4%) e estreptomicina (18,4%).

É importante ressaltar que existem poucos estudos na literatura sobre prevalência de *Salmonella* em tilápia cultivada e perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de tilápia, especialmente no Brasil. Em uma pesquisa realizada por Costa *et al.* (2015), verificou-se a presença de *Salmonella* spp. em filés de tilápias e de peças inteiras do mesmo peixe em pesque-pagues do interior do Estado de São Paulo. Para tal, foram obtidos 36 exemplares de tilápia, sendo que após o abate e filetagem no próprio estabelecimento, os peixes (n=18) e os filés (n=18) foram submetidos ao isolamento *Salmonella* spp. Foi verificada elevada presença de *Salmonella* spp. nas amostras de tilápia (58,34%), sendo que 10 amostras de peixe inteiro e 11 amostras de filés estavam contaminadas, mostrando que provavelmente a água dos tanques desses pesque-pagues estava contaminada com *Salmonella* spp. e que o processo de filetagem não teve grande influência no processo de contaminação.

As informações obtidas sobre resistência antimicrobiana são importantes para o entendimento epidemiológico e podem auxiliar no controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes. Além disso, o conhecimento do perfil de resistência e identificação dos genes de resistência de cepas isoladas de humanos e de animais podem guiar tratamentos empíricos, diminuindo o período médio de tratamento e as complicações clínicas (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; FRASER *et al.*, 2006).

1.7. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são medicamentos que atuam na inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática ou da morte de uma população bacteriana, por uma ação bactericida. As interações dos antibacterianos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede celular (estrutura e biossíntese), membrana citoplasmática (estrutura e função), síntese de proteínas e síntese de ácidos nucleicos (PANKEY; SABATH, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

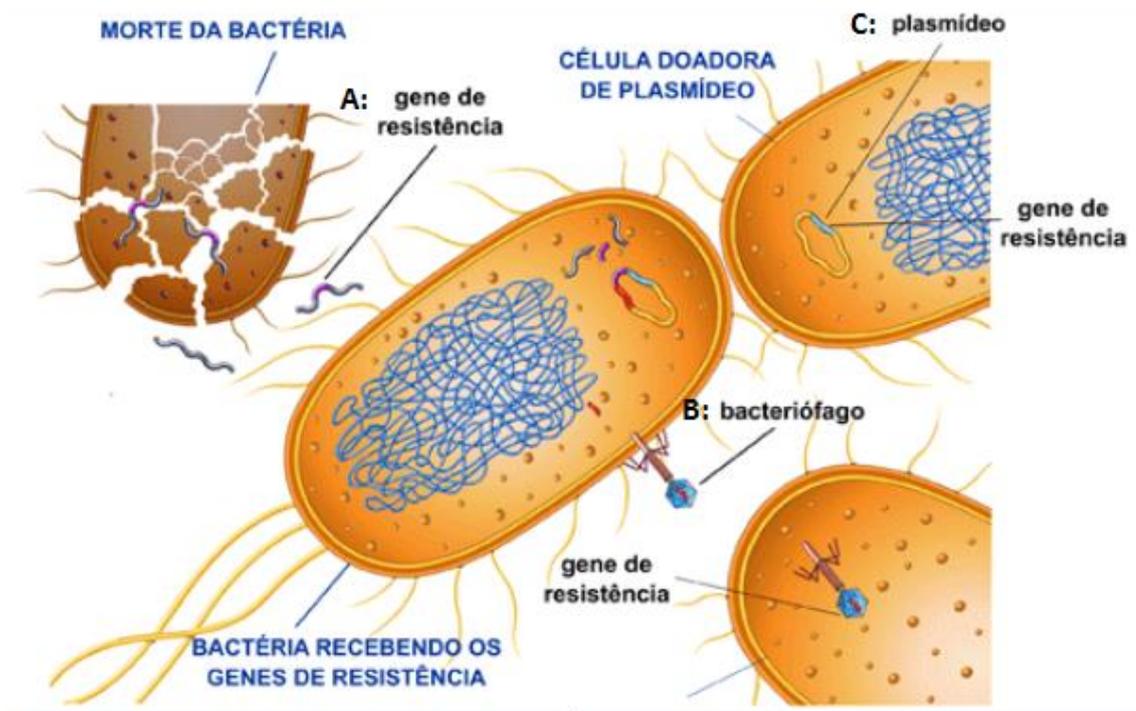
Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que tem a capacidade de multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano e um dos fatores que aumentam essa resistência é a evolução e disseminação de genes de resistência em populações bacterianas (FAIR; TOR, 2014; MENDONÇA, 2016).

A aquisição de resistência bacteriana é decorrente de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente e as alterações genéticas podem ter origem de mutações cromossômicas, aquisição de plasmídeos de resistência ou por transposons (TORTORA *et al.*, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Os plasmídeos são moléculas circulares de dupla fita de DNA que se replicam de forma independente do DNA cromossômico, já os transposons são sequências móveis de DNA que se movimentam em diferentes posições dentro do genoma em uma única célula (SYKES, 2010).

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação. Esses mecanismos podem ser transferidos de forma vertical, por herança genética, ou horizontal pela aquisição de materiais genéticos exógenos, presente em outros microrganismos. A característica intrínseca é um fenômeno natural de certas espécies poderem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional, desenvolvida para sua sobrevivência (BAPTISTA, 2013; ROLAIN, 2013).

A transferência horizontal ocorre pela aquisição de material genético exógeno, presente em outro microrganismo, a qual pode acontecer por três mecanismos: transformação, transdução ou conjugação (Figura 4). Na transformação a bactéria recebe fragmentos de DNA que podem vir como resultado da morte ou lise da bactéria doadora. Na transdução, o microrganismo recebe o material genético através de bacteriófagos que funcionam como vetores dessa porção de DNA. Já na conjugação, o plasmídeo é transferido entre as células bacterianas através do contato direto (BAPTISTA, 2013; KENNETH; RAY, 2004).

Figura 4. Mecanismos de transferência genética bacteriana. **A:** Transformação. **B:** Transdução
C: Conjugação



Fonte: Adaptado de ANVISA (2007)

As bactérias possuem mecanismos bioquímicos bem caracterizados pelos quais se tornam resistentes a antibióticos. Dentre estes, destacam-se: bloqueio da entrada do fármaco na célula (alteração da permeabilidade), a alteração do sítio de ação do fármaco, efluxo celular do fármaco (bomba de efluxo) e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antimicrobiano (ANVISA, 2007; CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017; TORTORA *et al.*, 2017). Os genes de resistência contidos em plasmídeos, geralmente são responsáveis por codificarem enzimas que inativam os fármacos ou reduzem a permeabilidade das células; já os genes de resistência precedentes de mutações cromossômicas são descritos por envolverem a alteração do local de ação do fármaco (BAPTISTA, 2013; KENNETH; RAY, 2004).

1.7.1 Resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos

Os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana. Esses fármacos têm uma estrutura central comum, contendo um anel β -lactâmico, capaz de impedir a ligação cruzada entre peptidoglicanos, que ocorre externamente à membrana citoplasmática, interferindo na função de várias enzimas que participam da síntese

da parede celular. Esse mecanismo é baseado na união dos fármacos β -lactâmicos a receptores específicos que se encontram na superfície interna da membrana celular bacteriana, chamados de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (ANVISA, 2007). Nessa classe de antimicrobianos estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos, que são diferenciados pelas cadeias laterais químicas associadas aos seus núcleos (TORTORA *et al.*, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos acontece principalmente através da produção das β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dos fármacos, transformando-os em produtos inativos. Entre os genes codificadores de enzimas β -lactamases já identificados nas bactérias são descritos os genes *bla*: *TEM*, *SHV*, *PSE*, *OXA*, *PER*, *CTX-M*, *CMY*, *ACC* e *DHA* ou *KPC* (MENDONÇA, 2016; MICHAEL *et al.*, 2006). Dentre as enzimas, destacam-se as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), enzimas produzidas por certas bactérias que são capazes de hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido, como ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima e oximinomonobactâmio. As enzimas com características ESBL são frequentemente codificadas por grandes plasmídeos ou elementos móveis que carregam múltiplos determinantes da resistência e podem-se destacar as famílias TEM, SHV, OXA e as CTX-M, sendo o grupo de enzimas do tipo CTX-M uma das mais predominantes desse conjunto de enzimas (ANVISA, 2007; GHAFOURIAN *et al.*, 2015).

Outros mecanismos de resistência consistem em alterações na afinidade das proteínas ligadoras de penicilina ao antimicrobiano (MARCH, 2013), e também na diminuição da permeabilidade bacteriana ao antimicrobiano impedindo que drogas antibacterianas tenham acesso a sítios alvos no interior da célula, através de mutações e modificações nas porinas (CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017).

A alteração de PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos β -lactâmicos nas bactérias cocos Gram-positivas (ANVISA, 2007), inclusive a resistência de pneumococos à penicilina deve-se a esse mecanismo, decorrente de alterações cromossômicas da bactéria (MARCH, 2013). Contudo, a produção de enzimas β -lactamases é considerada o principal mecanismo de resistência contra agentes β -lactâmicos entre as bactérias Gram-negativas, especialmente as enterobactérias (CROFTS; GASPARRINI; DANTAS, 2017; GHAFOURIAN *et al.*, 2015).

1.7.2 Resistência aos antimicrobianos da classe das tetraciclinas

As tetraciclinas são agentes antimicrobianos com amplo espectro de ação que se estende a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, microrganismos anaeróbicos, micobactérias (como *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium leprae*) e protozoários (como *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Toxoplasma gondii*) (GROSSMAN, 2016; JARA, 2010; PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010). O mecanismo de ação da tetraciclina consiste na ligação a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese proteica (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

A resistência às tetraciclinas tem sido um problema de saúde pública que limita seu uso no tratamento de infecções bacterianas em humanos. Existem três mecanismos de resistência às tetraciclinas descritos: o efluxo do medicamento, a proteção ribossomal e a inativação enzimática de drogas tetraciclinas, sendo os dois primeiros mecanismos os mais descritos na literatura (GROSSMAN, 2016).

As proteínas de efluxo são comumente encontradas em bactérias Gram-negativas e estas proteínas de membrana (Tet) diminuem a concentração intracelular do antimicrobiano dentro das células bacterianas. Esta ação é dependente de energia e acontece pela troca de um próton por um complexo cátion tetraciclina em um ambiente contra o gradiente de concentração (JARA, 2010; PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010). Enquanto na proteção ribossomal, a resistência é mediada por proteínas citoplasmáticas que protegem o ribossomo da ação das tetraciclinas, sendo as proteínas Tet (O) e Tet (M) as mais estudadas (JARA, 2010).

De acordo com Roberts (2005) existem 38 genes de resistência às tetraciclinas descritos (genes *tet* e *otr*), que incluem 23 genes que codificam proteínas de efluxo dependentes de energia, 11 genes que codificam proteínas de proteção ribossomal, 3 genes que codificam enzimas inativadoras de drogas e 1 gene com um mecanismo de resistência desconhecido. Todos os genes *tet* codificam proteínas associadas a membrana que exportam o antimicrobiano para fora da célula. Os genes *tet* têm sido encontrados em *Salmonella* e as proteínas codificadas por esses genes podem exportar tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, e em contraste com as proteínas tetA, tetC, tetD e tetG, a proteína tetB mostrou ser também capaz de exportar minociclina (MICHAEL *et al.*, 2006).

1.7.3 Resistência aos antimicrobianos da classe das sulfonamidas

As sulfonamidas têm sido amplamente usadas na medicina humana e veterinária. No grupo das Sulfonamidas as seis drogas principais são: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol, sendo as duas últimas de maior importância clínica (ANVISA, 2007).

As sulfonamidas exibem um amplo espectro de ação contra a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Atuam inibindo a proliferação das bactérias, através da inibição competitiva da di-hidropteroato sintase (DHPS). No ciclo do metabolismo do ácido fólico, a enzima DHPS catalisa a condensação do ácido p-aminobenzóico (PABA) e 7,8-dihidro-6-hidroxipteroína-pirofosfato (DHPPP), que formam o ácido di-hidropteroico, o penúltimo passo na formação de ácido di-hidrofólico. A síntese do ácido fólico ou vitamina B9 é essencial para a construção do DNA e RNA nas bactérias (SKÖLD, 2000; TENOVER, 2006; TORTORA *et al.*, 2017).

A resistência as sulfonamidas é conferida por mutações no gene DHPS ou a partir da aquisição de um gene DHPS alternativo (BYRNE-BAILEY *et al.*, 2009). Neste contexto, existem três diferentes genes de resistência às sulfonamidas que podem ser adquiridos, os genes *sul1*, *sul2* e *sul3*, e a resistência a esta droga ocorre pela codificação do gene em isoformas da enzima-alvo do fármaco na síntese do ácido fólico, as quais apresentam baixa afinidade às sulfonamidas (ANTUNES *et al.*, 2005).

Esses genes de resistência as sulfonamidas são frequentemente encontrados em bactérias Gram-negativas e diversas espécies bacterianas abrigam esses genes, incluindo a *Salmonella* (BYRNE-BAILEY *et al.*, 2009). Esses genes são localizados em transposons ou em plasmídeos transferíveis, que podem passar para uma ampla gama de hospedeiros, caracterizados pela múltipla resistência antimicrobiana (ANVISA, 2007).

1.7.4 Resistência aos antimicrobianos da classe dos fenicóis

O cloranfenicol é um antibacteriano de largo espectro de ação, sendo efetivo tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação reversível à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a peptidil transferase, enzima que atua na produção de proteínas bacterianas (LEONÍDIO *et al.*, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

O cloranfenicol é uma das principais drogas utilizadas para o tratamento das infecções causadas por *Salmonella* e foi considerada como droga de primeira escolha para o tratamento da febre tifoide durante um longo período, o que levou a seleção de cepas cloranfenicol-resistentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). O tianfenicol e florfenicol são análogos do cloranfenicol, possuem eficácia semelhante e se diferenciam por não induzir aplasia medular. No Brasil, o uso do cloranfenicol em animais de produção é proibido, enquanto que o florfenicol é utilizado para o tratamento de enfermidades infecciosas do trato respiratório e digestivo de suínos e bovinos (LEONÍDIO *et al.*, 2015), como também no tratamento de enfermidades na piscicultura (SILVA *et al.*, 2018).

Neste sentido, a resistência a essa classe de antibióticos em *Salmonella* é conferida por dois tipos diferentes de mecanismos: através da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) do tipo A ou B que inativa as moléculas de cloranfenicol, codificadas pelo grupo dos genes *cat* e através do mecanismo de efluxo ativo, conferido pelos genes *cmlA* e *floR* (MICHAEL *et al.*, 2006). As enzimas CAT acetilam o cloranfenicol, fazendo com que ele perca a afinidade pelo seu alvo. Enquanto os sistemas de efluxo em bactérias protegem as células dos antimicrobianos por transportar ativamente os compostos para fora do citoplasma e limitar assim o seu acúmulo em seu local de ação. Com isso a proteína Cml, codificada pelo gene *cmlA*, é responsável pelo transporte de Cloranfenicol para fora da célula e a proteína Flo, codificada pelo gene *floR*, é capaz de mobilizar tanto o cloranfenicol como o florfenicol (MENDONÇA, 2016; TORTORA *et al.* 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste estudo foram verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de filé de tilápia fresca comercializadas nos supermercados no Distrito Federal e avaliar o perfil de resistência antimicrobiana das cepas *Salmonella* spp. isoladas dessas amostras de tilápia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de filé de tilápia fresca através das análises microbiológicas
- Realizar a confirmação molecular das cepas de *Salmonella* spp. isoladas das amostras de tilápia através da detecção do gene *InvA*
- Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. através da técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer)
- Pesquisar a presença dos genes de resistência antimicrobiana *blaCTX*, *tetB*, *sul2* e *floR* nas cepas *Salmonella* spp.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA, PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram coletadas 101 amostras de peixe fresco (filé de tilápia) em onze diferentes supermercados do Distrito Federal no período de um ano, entre março de 2019 e março de 2020, nas regiões do Guará, Sudoeste, Gama, Taguatinga, Águas Claras e Ceilândia. Todas as amostras estavam expostas ao consumo em balcões refrigerados dos estabelecimentos, embaladas em bandejas de isopor. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia (UNB/FCE), transportadas em caixa de gelo, e foram analisadas imediatamente na chegada ao laboratório.

A metodologia utilizada para pesquisa e isolamento de *Salmonella* spp. foi adaptada do Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011). Em três repetições, 25 g de cada amostra foram diluídas asépticamente com 225 mL de água de peptonada 0,1% (p/v), como forma de pré-enriquecimento. Após 18-24 h de incubação em estufa a 37°C, alíquotas desse caldo de enriquecimento foram transferidas para o caldo seletivo tetracionato com iodo e/ou caldo selenito cistina e incubadas a 37°C por 24 h. Esses meios funcionam como enriquecimento seletivo, contribuindo para a multiplicação das bactérias *Salmonella* e restringindo o crescimento da microbiota acompanhante. Após a incubação, alíquotas foram transferidas para os meios Ágar *Salmonella* Shigella (Ágar SS) e/ou Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Ágar XLD). As colônias não fermentadoras de lactose (com ou sem pigmento preto) foram transferidas do Ágar SS e/ou Ágar XLD para o meio de cultivo Ágar Três Açúcares e Ferro (Ágar TSI). Esse meio bioquímico tem como base a fermentação e produção de gás a partir do uso dos carboidratos: glicose, lactose e sacarose e também se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H₂S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, indicado pela cor negra na base da porção central do tubo, uma reação característica de enterobactérias como a *Salmonella* (BRASIL, 2011).

Os tubos de Ágar TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* spp. foram repicados nos meios bioquímicos Agar Lisina-Ferro (Ágar LIA) e Agar Fenilalanina (Ágar FA) e incubados na estufa bacteriológica a 37°C entre 18-24 h. A presunção de *Salmonella* spp. no Ágar LIA é visualizada pela descarboxilação da lisina, evidenciada pela coloração púrpura e produção de H₂S (cor negra na base da porção central do tubo). O teste da fenilalanina é baseado na detecção de ácido fenilpirúvico, que uma vez liberado no meio, sua presença (cor esverdeada) é visualizada pela adição de uma solução de cloreto férrico a 10%. Entre os

membros da família *Enterobacteriaceae*, somente espécies dos gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* possuem a enzima desaminase, necessária para a conversão da fenilalanina no cetoácido, ácido fenilpirúvico (BRASIL, 2011). Portanto, os tubos que apresentaram reações típicas de *Salmonella* spp. no Ágar LIA e não apresentarem a cor verde indicativa no Ágar FA, foram novamente repicadas para os meios Ágar SS e/ou Ágar XLD e levados para a estufa a 37°C por 24 h. As colônias puras isoladas do Ágar SS e/ou Ágar XLD foram utilizadas para a sequente avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e extração de DNA. Todas as análises foram realizadas em três repetições, ou seja, três alíquotas de 25 g de cada bandeja de filé de tilápia foram analisadas.

3.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS BACTÉRIAS *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS

A susceptibilidade das cepas de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) (BRCAST, 2019). Foram testados nove antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico (20 + 10 µg) (β-lactâmico/penicilina), ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), gentamicina (10 µg) (aminoglicosídeo), cloranfenicol (30 µg) (fenicol), imipenem (10 µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30 µg) (tetraciclina), ciprofloxacino (5 µg) (quinolona) e sulfonamida (300 µg) (sulfonamida) (Newprov[®]).

As colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para um tubo contendo 4-5 mL de Caldo Luria Bertani (caldo LB). A turbidez da cultura foi ajustada através do uso de espectrofotômetro (Shimadzu[®]), utilizando um limite de leitura entre 0,08 e 0,10 no comprimento de onda de 625 nm, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Em placa de petri contendo Ágar Mueller-Hinton, o inóculo foi colocado uniformemente, de modo a cobrir homoganeamente toda a superfície da placa. Os discos contendo antimicrobianos foram aplicados no meio inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados, levemente, sob a superfície do meio. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa a 37°C (até 15 minutos após a aplicação dos discos) e incubadas por 18-24 h. Após incubação, foi realizada a leituras dos antibiogramas por medida dos diâmetros dos halos de inibição e as cepas foram classificadas como sensível, intermediário ou resistente de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (CLSI, 2020).

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das amostras, que consistiu em cultivar por 16-24 h as colônias das bactérias isoladas suspeitas de serem *Salmonella* spp. em caldo LB. A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit Purelink Genomic DNA[®], seguindo o protocolo para extração de bactérias Gram-negativas. Centrifugaram-se as amostras por 5 minutos na velocidade de 3500 rpm e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 180 µL do Genomic Digestion Buffer e 20 µL da Proteinase K. Após isso, os tubos foram homogeneizados sob agitação e colocados em banho-maria a 55°C por 3-4 h.

Em seguida, foram adicionados 20 µL do RNase e homogeneizou-se e após as amostras ficarem em temperatura ambiente por 3 minutos, foram adicionados 200 µL do tampão Genomic Lysis/Binding e 200 µL de Etanol 96-100%, homogeneizou-se e deixou em repouso por 5 segundos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo intracelular).

As amostras de DNA foram passadas para uma coluna de separação com tubo coletor, no qual foram centrifugadas por 1 minuto na velocidade de 3500 rpm. O líquido do tubo coletor foi descartado e adicionou-se 500 µL do tampão Wash Buffer 1 à coluna com tubo coletor, que em seguida foi centrifugado por 1 minuto na velocidade de 3500 rpm. O líquido do tubo coletor foi descartado e o mesmo procedimento foi realizado adicionando 500 µL do tampão Wash Buffer 2.

Após isto, o filtro foi colocado em um tubo eppendorf e foram adicionados 100 µL do tampão Elution Buffer (este tampão promove a eluição do DNA) e centrifugou-se as amostras de DNA por 2 minutos na velocidade de 3500 rpm. Então descartou-se o filtro e as amostras contidas no tubo eppendorf foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas pela quantificação no equipamento NanoDrop One (ThermoFisher[®]) e por eletroforese em gel de agarose.

3.4. ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o gene *invA* e para análise molecular dos genes de resistência antimicrobiana das cepas identificadas como *Salmonella* foram pesquisados os genes *bla*CTX, *tetB*, *sul2* e *floR*. As análises moleculares foram realizadas

a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica várias cópias da região genômica selecionada. As sequências de oligonucleotídeos e condições de termociclagem estão descritas na Tabela 1.

Nas análises dos genes *invA*, *sul2*, *blaCTX* para cada reação foram usadas quantidades padronizadas dos reagentes tampão 10X Taq Pol, (Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil); MgCl₂ (50 mM, Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil); dNTPs (2,5mM; Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil); Taq-Polimerase (5U/μL, Ludwig Biotecnologia LTDA, Brasil) e oligonucleotídeo forward e reverse (Invitrogen Life Technologies, EUA, 10 pmol/μL), estas quantidades estão descritas na tabela 2. Foram utilizados 4,0 μL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/μL mais a quantidade dos reagentes, em todas as reações completando com água ultrapura para um volume final de 25 μL.

Tabela 1. Quantidade dos reagentes utilizados na identificação dos genes *invA*, *blaCTX*, *tetB*, *sul2* e *floR*

Gene	DNA (2,5 ng/μL)	Tampão 10X Taq Pol	MgCl ₂ (50 mM)	dNTPs (2,5mM)	Taq- Polimerase (5U/μL)	Oligonucleotídeo forward e reverse (10 pmol/μL)
<i>invA</i>						
<i>blaCTX</i>			1,2 μL	2 μL	0,4 μL	0,5 μL
<i>tetB</i>	4,0 μL	2,5 μL	0,4 μL	1,5 μL	0,2 μL	0,6 μL
<i>sul2</i>			1,2 μL	2 μL	0,4 μL	0,5 μL
<i>floR</i>			0,9 μL	2 μL	0,4 μL	1 μL

As condições de termociclagem estão descritas na Tabela 1 e à amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando os termocicladores Life Express Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b), Swift MiniPro Thermal Cycler modelo SWT-MIP-0-2-1 e Life Touch Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b)B.

Tabela 2. Sequência dos primers, tamanho dos produtos amplificados e condições de termociclagem na PCR para identificação dos genes *invA*, *blaCTX*, *tetB*, *sul2* e *floR*

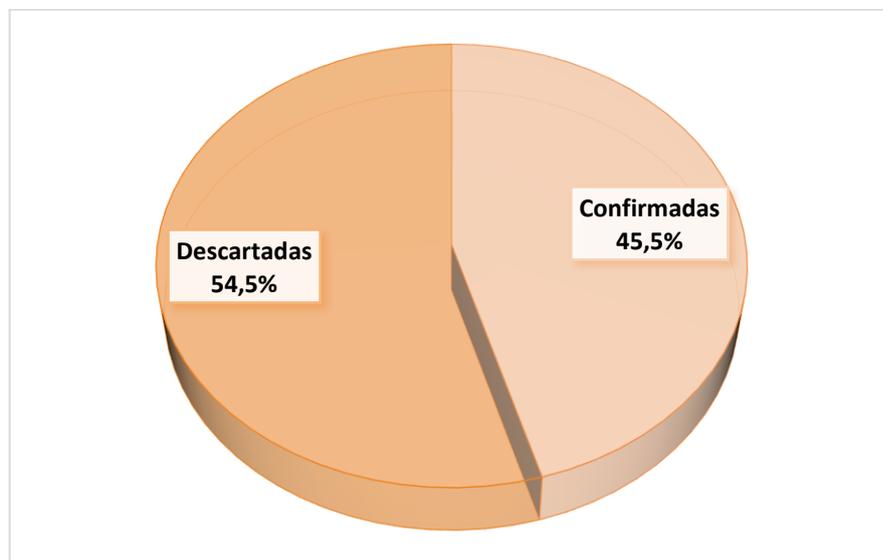
Gene	Oligos Forward (5'→3') e Reverse (5'→3')	Tamanho	Condições de termociclagem	Referência
<i>invA</i>	CATTGGTGATGGTCTTGTCG CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG	298 pb	95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação 95°C por 1 min, de anelamento 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 min para a extensão final	(Araújo, 2015)
<i>blaCTX</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA AGTGACCAGAATCAGCGG	585 pb	94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 s, anelamento 55 °C por 30 s, extensão 72 °C por 50 s e 72 °C por 7 min para extensão final	(Li <i>et al.</i> , 2013)
<i>tetB</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	659 pb	94 °C por 5 min, 34 ciclos de desnaturação 94 °C por 25 s, anelamento 55 °C por 30 s, extensão 72 °C por 50 s e 72 °C por 5 minutos para extensão final	(Zishiri, Mkhize e Mukaratirwa, 2016)
<i>sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTTGATACCGGCACCCGT	285 pb	95 °C por 10 min; 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55–70 °C por 50 segundos, 72 °C por 50 s e 72 °C por 10 minutos para extensão final	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)
<i>floR</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT ATGCAGAAGTAGAACGCG	868 pb	94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 s, anelamento por 30 s, extensão 72 °C por 1 min e extensão de 72°C for 5 min para extensão final	(Thai <i>et al.</i> , 2012)

Após a realização desses procedimentos, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo em uma potência de 80W e visualizados sob iluminação ultravioleta com a utilização do marcador de massa molecular de 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

4. RESULTADOS

No presente estudo, 101 amostras de filé de tilápia fresca foram analisadas para a detecção de *Salmonella* spp., e 46 amostras apresentaram a bactéria *Salmonella* spp. confirmada pela detecção do gene de virulência *invA* na análise molecular. Portanto, 45,5% das amostras pesquisadas (Gráfico 2) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, que determina a ausência de *Salmonella* spp. no pescado (BRASIL, 2019).

Gráfico 2. Ocorrência de *Salmonella* spp. nas amostras de filé de tilápia, confirmada pela detecção do gene de virulência *InvA*



Das 46 amostras de filé de tilápia positivas, foram isoladas 57 cepas de *Salmonella* spp. e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dessas bactérias está apresentado na Tabela 2. A classificação das cepas como sensível, intermediário e resistente foi determinada conforme CLSI (2020), através do diâmetro em mm do halo medido no antibiograma.

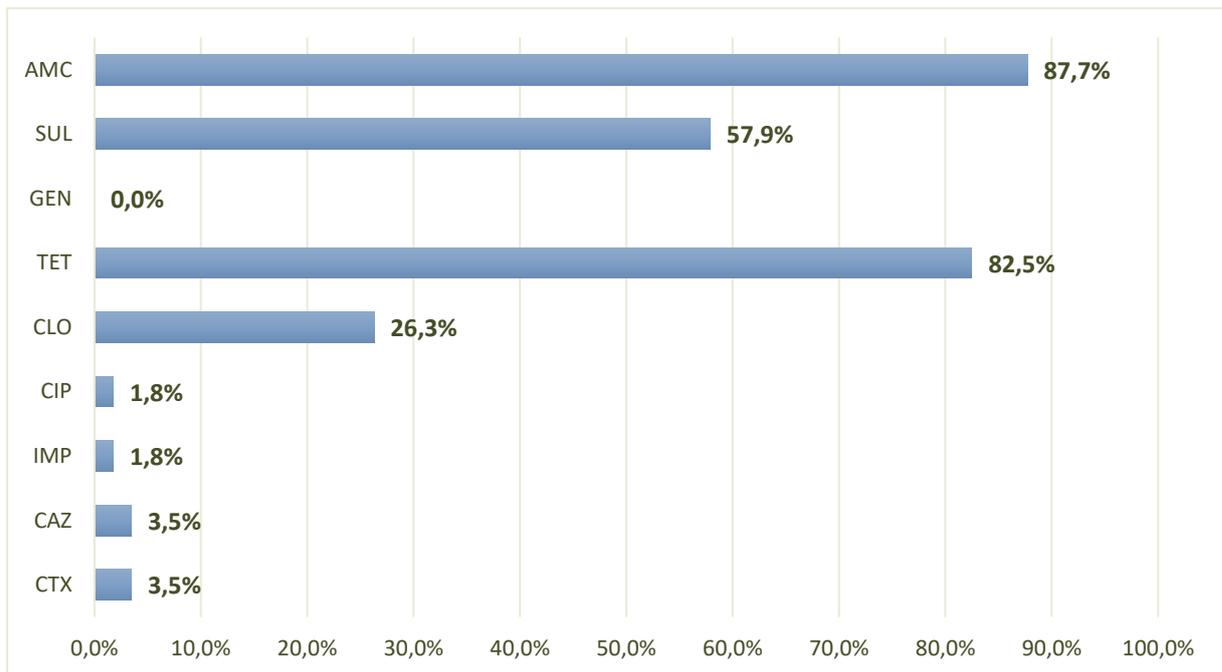
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *Salmonella* spp. isoladas das amostras de filé de tilápia fresca

Antimicrobianos	S	I	R
	n (%)	n (%)	n (%)
Amoxicilina*	7 (12,3%)	0,0%	50 (87,7%)
Sulfonamida	16 (28,1%)	8 (14,0%)	33 (57,9%)
Gentamicina	47 (82,5%)	10 (17,5%)	0,0%
Tetraciclina	7 (12,3%)	3 (5,3%)	47 (82,5%)
Cloranfenicol	35 (61,4%)	7 (12,3%)	15 (26,3%)
Ciprofloxacina	54 (94,7%)	2 (3,5%)	1 (1,8%)
Imipenem	37 (64,9%)	19 (33,3%)	1 (1,8%)
Ceftazidima	36 (63,2%)	19 (33,3%)	2 (3,5%)
Cefotaxima	51 (89,5%)	4 (7,0%)	2 (3,5%)

* amoxicilina/ácido clavulânico; S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação as 57 cepas analisadas

Observou-se que as cepas de *Salmonella* spp. foram mais sensíveis aos antimicrobianos ciprofloxacina (94,7%, 54/57) e cefotaxima (89,5%, 51/57). O imipenem e a ceftazidima apresentaram o maior número de cepas intermediárias (33,3%) e foram observadas altas taxas de resistência aos seguintes medicamentos: amoxicilina/ácido clavulânico (87,7%, 50/57), tetraciclina (82,5%, 47/57), sulfonamida (57,9%, 33/57) e cloranfenicol (26,3%, 15/57), sendo a gentamicina o único antimicrobiano que não apresentou resistência as cepas estudadas (Gráfico 3).

Gráfico 3. Porcentagem de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de tilápia fresca



% = porcentagem em relação ao total de cepas

A Tabela 3 apresenta a resistência antimicrobiana e a resistência a múltiplas drogas das cepas de *Salmonella* spp. isoladas das amostras de tilápia fresca. Neste contexto, apenas 5,3% (3/57) dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 38,6% (22/57) dos isolados foram resistentes a um ou dois antimicrobianos testados e a multirresistência foi observada em 56,1% (32/57) dos isolados. O perfil de multirresistência a três antimicrobianos foi encontrado em 33,3% (19/57) dos isolados, seguido da multirresistência a quatro antimicrobianos em 19,3% (11/57) dos isolados.

Tabela 4. Resistência antimicrobiana e resistência a múltiplas drogas (MDR) dos isolados de *Salmonella* spp.

Nº de antimicrobianos resistentes	Número e porcentagem de isolados	
	N	(%)
0	3	5,3
1	5	8,8
2	17	29,8
3	19	33,3
4	11	19,3
5	2	3,5
Total	57	100
MDR (soma de 3, 4 e 5)	32	56,1

% = porcentagem em relação ao total de cepas; MDR = Resistência a múltiplas drogas

Os perfis de resistência antimicrobiana das bactérias *Salmonella* spp. isoladas das amostras de tilápia fresca estão apresentados na Tabela 4. No total, foram encontrados 12 perfis de resistência antimicrobiana e o perfil mais encontrado foi SUL, AMC e TET (24,6%, 14/57), seguido por SUL, AMC, TET e CLO (17,5%, 10/57) e AMC e TET (21,1%, 12/57).

Tabela 5. Perfil de resistência antimicrobiana das bactérias *Salmonella* spp. isoladas das amostras de filé de tilápia fresca

Perfis	Resistência Antimicrobiana	Número de cepas	%
1	CAZ AMC CTX TET CLO	1	1,8
2	SUL CAZ AMC CTX TET	1	1,8
3	SUL AMC TET CLO	10	17,5
4	SUL IMP AMC TET	1	1,8
5	AMC TET CLO	4	7,0
6	SUL AMC TET	14	24,6
7	SUL CIP AMC	1	1,8
8	AMC TET	12	21,1
9	SUL AMC	2	3,5
10	SUL TET	3	5,3
11	AMC	4	7,0
12	SUL	1	1,8

AMC: amoxicilina/ácido clavulânico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, IMP: imipenem, SUL: sulfonamida, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacino; % = porcentagem em relação ao total de cepas

Pesquisou-se nas bactérias *Salmonella* spp. alguns genes de resistência que estão relacionados aos fármacos que apresentaram maior resistência antimicrobiana no antibiograma: amoxicilina/ácido clavulânico (gene *blaCTX*), tetraciclina (gene *tetB*), sulfonamida (gene *sul2*) e cloranfenicol (gene *floR*). Esses genes de resistência antimicrobiana foram pesquisados em todos os 57 isolados de *Salmonella*, ou seja, nas cepas que foram classificadas como resistentes, sensíveis ou intermediárias aos respectivos antimicrobianos (Tabela 5). O gene *blaCTX* foi identificado em 64,9% dos isolados (37/57), o gene *tetB* em 54,4% (31/57), o gene *sul2* em 49,1% (28/57) e o gene *floR* em 50,9% (29/57).

Tabela 6. Presença dos genes de resistência antimicrobiana nos 57 isolados de *Salmonella* spp.

Genes de resistência	Perfil de resistência antimicrobiana			Total n (%)
	R	S	I	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>blaCTX</i>	33 (57.9) ^a	1 (1.8) ^b	3 (7.0) ^c	37 (64.9)
<i>tetB</i>	27 (47.4)	2 (3.5)	2 (3.5)	31 (54.4)
<i>sul2</i>	19 (33.3)	6 (10.5)	3 (5.3)	28 (49.1)
<i>FloR</i>	11 (19.3)	14 (24.6)	4 (7.0)	29 (50.9)

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de cepas.

a: Contagem de cepas em relação a resistência apresentada a pelo menos um dos β-lactâmicos testados;

b: Contagem de cepas sensíveis aos 4 β-lactâmicos testados;

c: Contagem de cepas que não apresentaram resistência a nenhum dos 4 β-lactâmicos testados, e pelo menos uma delas apresentou sensibilidade intermediária.

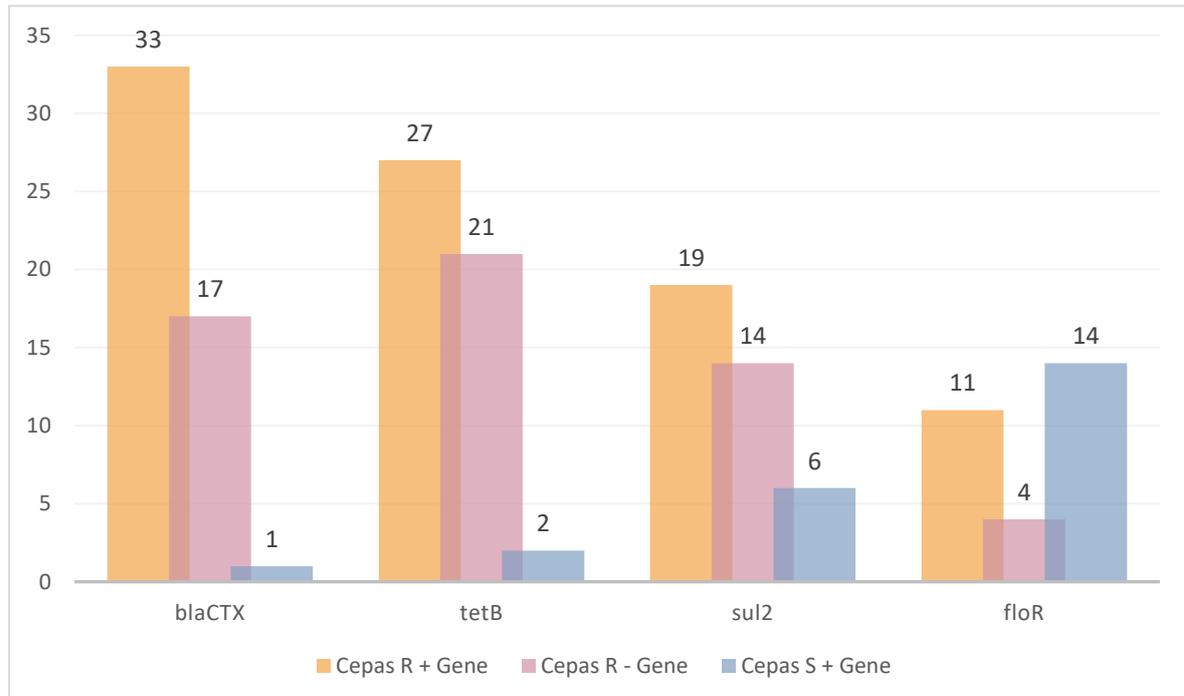
O Gráfico 4 mostra a relação entre a presença dos genes de resistência e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. Entre os antimicrobianos β-lactâmicos pesquisados, a amoxicilina/ácido clavulânico foi o medicamento que apresentou o maior número de cepas resistentes com o gene *blaCTX* em seu material genético (66%, 33/50). Dessas cepas resistentes no antibiograma aos β-lactâmicos, 34% (17/50) não apresentaram o gene *blaCTX*. O gene *blaCTX* também foi encontrado em cepas que apresentaram no antibiograma o perfil intermediário aos antimicrobianos imipenem (1/57) e ceftazidima (2/57).

A partir das 47 cepas de *Salmonella* spp. resistentes a tetraciclina no antibiograma, 54,4% (27/47) das cepas apresentaram o gene *tetB* em seu material genético e 42,6% (21/47) não apresentaram o respectivo gene. Em relação as 33 cepas resistentes a sulfonamida no antibiograma, 57,6% (19/33) das cepas apresentaram o gene *sul2* e 42,4% (14/33) das cepas não apresentaram o respectivo gene. E entre as 16 cepas sensíveis a sulfonamida no antibiograma, o gene *sul2* estava presente em 37,5% (6/16) dos isolados de *Salmonella* spp.

Quanto ao gene de resistência *floR*, 73,3% (11/15) das cepas que apresentaram resistência ao cloranfenicol no antibiograma tiveram a presença desse gene em seu material genético e 22,2% (4/18) das cepas resistentes não apresentaram o gene *floR*. Vale destacar que

entre os 35 isolados de *Salmonella* spp. sensíveis ao cloranfenicol no antibiograma, uma porcentagem considerável de 40% (14/35) das cepas apresentou o gene *floR*.

Gráfico 4. Relação entre a presença dos genes de resistência e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp.



Cepas R + gene = número de cepas resistentes no antibiograma que apresentaram o gene de resistência;

Cepas R – gene = número de cepas resistentes no antibiograma que não apresentaram o gene de resistência;

Cepas S + gene = número de cepas sensíveis no antibiograma que apresentaram o gene de resistência

A Tabela 5 mostra os vários perfis de genes de resistência encontrados nos isolados de *Salmonella* spp. Observa-se que todas as 57 cepas de *Salmonella* spp. neste estudo (incluindo aquelas susceptíveis a todos os antimicrobianos) apresentaram pelo menos um gene de resistência em seu genoma. Os isolados de *Salmonella* spp. mostraram um total de 15 perfis de resistência de genótipos distintos, indicando considerável diversidade de genes de resistência. A combinação dos genes *blaCTX* e *floR* foi a mais encontrada, sendo detectada em 12,3% (7/57) das cepas, enquanto 10,5% (6/57) das cepas de *Salmonella* a spp. apresentaram apenas o gene *blaCTX* e os quatro genes pesquisados *blaCTX*, *tetB*, *sul2* e *floR* foram encontrados juntos em 8,8% (5/57) das cepas.

Tabela 7. Perfis de genes de resistência nas cepas de *Salmonella* spp. isoladas das amostras de filé tilápia fresca

Perfis	Genes de resistência	Número de cepas	%
1	<i>blaCTX, tetB, sul2, floR</i>	5	8,8
2	<i>blaCTX, sul2, floR</i>	5	8,8
3	<i>blaCTX, tetB, floR</i>	4	7,0
4	<i>blaCTX, tetB, sul2</i>	2	3,5
5	<i>tetB, sul2, floR</i>	4	7,0
6	<i>blaCTX, floR</i>	7	12,3
7	<i>blaCTX, sul2</i>	3	5,3
8	<i>blaCTX, tetB</i>	5	8,8
9	<i>tetB, floR</i>	1	1,8
10	<i>tetB, sul2</i>	5	8,8
11	<i>sul2, floR</i>	1	1,8
12	<i>blaCTX</i>	6	10,5
13	<i>Tetb</i>	4	7,0
14	<i>sul2</i>	3	5,3
15	<i>floR</i>	2	3,5
Total		57	100

% = porcentagem em relação ao total de cepas

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a presença de *Salmonella* spp. foi confirmada em 45,5% das amostras de filés de tilápia comercializadas no Distrito Federal, ou seja, do total de 101 amostras analisadas, 46 amostras estavam impróprias para o consumo considerando que a legislação brasileira vigente determina a ausência de *Salmonella* spp. no pescado (BRASIL, 2019). Resultados semelhantes a esse estudo foram reportados por Budiati *et al.* (2013), onde os autores verificaram a presença de *Salmonella* spp. em 43,8% (14/32) das tilápias obtidas de mercados na Malásia, enquanto Awuor *et al.* (2011), encontraram *Salmonella* spp. em 31,7% das amostras de tilápias do Nilo coletadas no oeste do Quênia.

Recentemente, o estudo realizado por Lerma-Fierro *et al.* (2020), com amostras frescas de tilápia do Nilo comercializadas na forma de filé em peixarias no México, relatou que 33,3% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Os pesquisadores sugeriram como medidas para diminuir a contaminação dos filés de tilápia, o fortalecimento das práticas higiênicas, além de fiscalização do manuseio e comercialização do pescado.

No Brasil, poucos são os registros de pesquisa sobre a presença de *Salmonella* spp. em tilápia frescas. O estudo realizado por Bartolomeu *et al.* (2011) investigou a presença de *Salmonella* spp. nas etapas do processamento do filé de tilápia. Verificou-se a presença de *Salmonella* spp. em uma amostra de filé após a retirada da pele (etapa 3) e em três amostras de filé após a retirada do espinho central (etapa 4). A etapa 4 foi caracterizada pela maior manipulação do filé de tilápia e mostrou-se o principal ponto crítico para a contaminação por *Salmonella*. Segundo os autores, o escoamento de águas pluviais e esgoto para as águas fluviais, cria um ambiente propício para o desenvolvimento de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. que acabam contaminando o pescado. Na unidade processadora de tilápia observou-se que a retirada do filé era realizada previamente à evisceração do pescado, o que ocasionalmente causava o rompimento de vísceras e contaminação da faca de corte. Além disso, a mesma faca era utilizada sequencialmente para a filetagem das tilápias sem a devida higienização entre um peixe e outro.

A elevada ocorrência de *Salmonella* spp. nas amostras de tilápia no nosso estudo, pode estar relacionada a contaminação dos ambientes aquáticos e a contaminação no processamento e manipulação do pescado, incluindo a falta de armazenamento adequado (DANTAS FILHO *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2018). Neste sentido, deve-se considerar que as amostras da pesquisa foram filés de tilápia, e que quando os peixes são submetidos a filetagem, a higiene do manipulador e das superfícies utilizadas para manipulação de peixes são importantes fatores

que influenciam a contaminação, visto que a *Salmonella* spp. pode permanecer viável em superfícies de contato com alimentos por períodos significativos (MERINO *et al.*, 2019), mesmo sob baixas temperaturas (WEBBER *et al.*, 2019). O estudo de Bartolomeu *et al.* (2011) destacou a manipulação do filé de tilápia como o principal ponto crítico para a contaminação por *Salmonella*.

A contaminação do pescado por *Salmonella* spp. também pode ser oriunda dos criatórios. A bactéria *Salmonella* spp. não faz parte da microbiota natural do pescado e a contaminação do pescado ocorre através do contato com águas contaminadas e da ração contaminada utilizada para alimentação, influenciando diretamente a microbiota do peixe. Sabe-se que a prevalência de *Salmonella* spp. em galinhas e ovos é comum (SHINOHARA *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2017) e a ração comercial feita de miudezas de frango e ovos pode transferir *Salmonella* spp. ao ambiente de aquicultura (LUNESTAD *et al.*, 2007). Além disso, outra prática que tem se tornado cada vez mais comum é a utilização de camas de frango como adubo orgânico para fertilização dos tanques de piscicultura, o que certamente contamina as águas de cultivo com bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. (DANTAS FILHO *et al.*, 2020; ESPOSTO *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que fatores intrínsecos da carne do peixe faz com que ele seja um dos alimentos mais susceptíveis a deterioração (DANTAS FILHO *et al.*, 2020) de origem química (metais, pesticidas, antibióticos) ou biológica (biotoxinas, parasitas, vírus e bactérias). Portanto, Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 de 2014, que dispõe das boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, relata que os pescados frescos deverão ser expostos em temperatura máxima de 4°C (quatro graus Celsius) e os pescados resfriados deverão ser expostos à temperatura entre -0,5°C e 2°C (meio grau Celsius negativos e dois graus Celsius), onde seus produtos manipulados crus deverão ser armazenados até a temperatura de 2°C (dois graus Celsius) com validade de até 3 dias.

Deste modo, reveste-se de importância o controle sanitário da *Salmonella* em toda cadeia de produção da tilápia pela possibilidade de veiculação desta bactéria patogênica através do consumo desse alimento (CORTÉS-SÁNCHEZ; ESPINOSA-CHAURAND, 2018). A presença de *Salmonella* spp. nas amostras do nosso estudo traz uma preocupação à saúde pública, visto que *Salmonella* é responsável por uma das principais doenças transmitidas por alimentos, a salmonelose (SHINOHARA *et al.*, 2008).

Os resultados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos mostram que os antimicrobianos ciprofloxacina (94,7%) e cefotaxima (89,5%) foram os mais sensíveis as bactérias *Salmonella* spp. encontradas nas amostras de tilápia fresca. Neste sentido, a

cefotaxima, utilizada em nosso teste de susceptibilidade antimicrobiana, não possui recomendação de uso em animais de produção (OIE, 2019), e juntamente com a classe ciprofloxacina, é proibida como uso de aditivo melhorador de desempenho em animais (BRASIL, 2017). Desse modo, essas drogas se confirmam como opções de tratamento em casos graves de salmonelose humana (PARRY; THRELFALL, 2008), apesar de apresentarem resistência a algumas cepas encontradas na presente pesquisa, ciprofloxacina em 1 cepa (1,8%) e cefotaxima em 2 cepas (3,5%).

Quanto aos medicamentos mais resistentes, há uma considerável ocorrência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos nas amostras de tilápia fresca pesquisadas. Observou-se uma alta resistência aos antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (87,7%), tetraciclina (82,5%) e sulfonamida (57,9%). Os resultados observados neste estudo foram comparáveis ao estudo de Elhadi (2014) onde a maior resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de peixes de água doce importados na Arábia Saudita foram observadas para tetraciclina (90%) e amoxicilina/ácido clavulânico (45%). Zhang *et al.* (2015) relataram uma alta resistência a sulfonamidas (56,5%) e tetraciclina (34,1%) em sorovares de *Salmonella* isolados de produtos de aquicultura na China. A resistência ao cloranfenicol (26,3%) observada neste estudo foi comparável ao estudo de Budiatti *et al.* (2013) que relataram que as cepas de *Salmonella* isoladas de peixes de água doce coletados em mercados da Malásia eram resistentes ao cloranfenicol (37,2%) e a tetraciclina (67,4%).

Vale ressaltar que por vários anos a ampicilina, o cloranfenicol e o trimetoprim-sulfametoxazol foram antimicrobianos de escolha para o tratamento de salmonelose (PARRY; THRELFALL, 2008), e apesar desses antimicrobianos serem também proibidos como melhoradores de desempenho (BRASIL, 2017), o histórico de utilização dessas drogas por muitos anos reflete a resistência encontrada atualmente. Dessa forma as fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração são agora comumente usadas em adultos para tratamento de salmoneloses devido à ampla resistência ao cloranfenicol, ampicilina e cotrimoxazol (ADESIJI *et al.*, 2014) e, portanto, devem ser utilizadas de modo racional por serem antimicrobianos de importância crítica e alta prioridade para a saúde humana, muitas vezes como a única terapia possível ou uma das poucas disponíveis para as infecções graves em humanos, utilizadas para o tratamento de doenças transmitidas por alimentos, por exemplo, ou doenças causadas por microrganismos que adquiriram genes de resistência (WHO, 2019).

A multirresistência foi encontrada com alta frequência neste estudo (56,1%) nas cepas de *Salmonella* spp., a qual é evidenciada pelos diferentes perfis de resistência e perfis de genes de resistência encontrados, dentre os quais incluem-se drogas criticamente importantes na

terapia humana. Yang *et al.* (2015) e Zhang *et al.* (2015) relataram 34,0% e 43,3%, respectivamente, de multirresistência nas cepas de *Salmonella* spp. isoladas de produtos aquáticos (peixes de água doce e salgada e frutos do mar) de mercados de varejo na China. O aumento da resistência antimicrobiana da *Salmonella* spp. e a aquisição de resistência a agentes antimicrobianos de várias classes pode limitar as opções terapêuticas para o tratamento da salmonelose em humanos e animais, pois garante à bactéria a capacidade de sobrevivência a diferentes escolhas terapêuticas, possibilitando a disseminação destas cepas entre animais e humanos (ELHADI, 2014; HEREDIA; GARCÍA, 2018).

Ainda na presente pesquisa, entre os 57 isolados de *Salmonella* spp. pesquisados, o gene *blaCTX* associado à resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos foi o mais encontrado (64,9%, 37/57), seguido dos genes *tetB* (54,4%, 31/57), *sul2* (49,1%, 28/57) e *floR* (50,9%, 29/57). A presença de genes de resistência em isolados fenotipicamente susceptíveis e intermediários no antibiograma e de pelo menos um gene de resistência em todas as cepas estudadas, suscita a possibilidade de transferência de elementos genéticos móveis e do surgimento de novas cepas resistentes (BAPTISTA, 2013; THONG; MODARRESSI, 2011). Segundo Adesiji *et al.* (2014) alguns genes de resistência são silenciosos em bactérias *in vitro* e esses genes silenciosos podem se espalhar para outras bactérias, especialmente sob pressão de seleção do uso de antimicrobianos, o que pode justificar também a presença dos genes de resistência em cepas que não apresentaram resistência no antibiograma.

Entre os 87,7% (50/57) isolados de *Salmonella* spp. resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico, 66% (33/50) apresentaram o gene de resistência *blaCTX*. Os resultados da PCR estão de acordo com os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, onde a resistência a este fármaco foi a mais encontrada no antibiograma. Um estudo realizado por Fitch *et al.* (2016), com cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves no Brasil, detectou a presença da variante genética *blaCTX-M-2* em 58,2% (32/55) das cepas.

Neste sentido, estudos têm demonstrado a ocorrência de uma ampla variedade de genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Salmonella*. Entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Salmonella*, *blaCTX* é o gene de resistência mais difundido. O transporte e a aquisição do gene *blaCTX* está principalmente associado a um conjunto diversificado de plasmídeos transmissíveis e a sua disseminação entre diferentes espécies contribui para a persistência estável desse gene em *Salmonella* spp. (NAIR; VENKITANARAYANAN; KOLLANOOR JOHNY, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Entre os 82,5% (47/57) isolados de *Salmonella* spp. fenotipicamente resistentes à tetraciclina, 56,3% (27/47) apresentaram o gene de resistência *tetB*. De acordo com Zishiri et

al. (2016), *tetA* seguido por *tetB* são os genes mais comuns encontrados em isolados de *Salmonella* spp. resistentes à tetraciclina. Resultados similares foram observados por Zhu *et al.*, (2017) em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de frangos de corte ao longo do abate (*tetB* = 50%). Esses genes são responsáveis pela codificação de bombas de efluxo associadas a plasmídeos, transposons ou ambos, e muitas vezes são conjugativos, destacando o potencial de transferência desses genes para outras bactérias, ambiente, animais e humanos (MAKA; POPOWSKA, 2016).

Entre os 57,9% (33/57) dos isolados de *Salmonella* spp. fenotipicamente resistentes à sulfonamida, 33,3% (19/57) apresentaram o gene de resistência *sul2*. Pesquisadores observaram altas frequências do gene *sul2* em cepas de *Salmonella* spp. de origem animal. Zishiri *et al.* (2016) detectaram o gene *sul2* em 79% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de frangos, enquanto Zhu *et al.* (2017) constataram a presença desse gene em 97,8% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de frangos de corte e resistentes a sulfametoxazol. Os dois genes mais encontrados entre os isolados resistentes às sulfonamidas são o *sul1*, seguido pelo *sul2*, que codificam formas de diidropteroato sintase e cujo produto tem baixa afinidade por sulfonamidas. O gene *sul1* é normalmente encontrado ligado a outros genes de resistência em integrons de classe 1, enquanto o gene *sul2* é geralmente associado a pequenos ou grandes plasmídeos multirresistentes transmissíveis (MAKA *et al.*, 2015).

A maioria dos isolados resistentes ao cloranfenicol neste estudo foram positivos para o gene *floR*, assim, 73,3% (11/15) das cepas resistentes apresentaram esse gene. No estudo de Zhu *et al.* (2017) uma alta frequência desse gene (97,8%) foi observada em cepas de *Salmonella* spp. resistentes ao florfenicol. O gene *floR* é identificado principalmente em bactérias Gram-negativas e é responsável pela codificação da bomba de efluxo, sendo encontrado em cromossomos e plasmídeos e assim, está frequentemente associado a elementos genéticos móveis e ilhas genômicas (LU *et al.*, 2018).

A partir dos resultados deste estudo é possível fazer uma correlação das características fenotípicas e genotípicas apresentadas pelas cepas de *Salmonella* spp. (ainda que limitada, considerando os diversos genes e fatores que podem estar envolvidos no perfil de resistência dessas cepas), fornecendo evidência dos mecanismos de resistência envolvidos (ANVISA, 2007; FAIR e TOR, 2014; MENDONÇA, 2016). Assim, é importante o controle de uso de antimicrobianos na criação de peixes e a determinação do perfil de resistência das bactérias isoladas, para o estabelecimento do uso racional dos antimicrobianos tanto na cadeia produtiva do pescado, como também na medicina humana que utiliza esses antimicrobianos para o

tratamento de doenças (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014; HELKE *et al.*, 2017; PARRY; THRELFALL, 2008).

6. CONCLUSÃO

Este estudo revelou uma elevada ocorrência de *Salmonella* spp. em filés de tilápia coletados no Distrito Federal, Brasil. As bactérias apresentaram elevada resistência para amoxicilina/ácido clavulânico, tetraciclina, sulfonamida e cloranfenicol. Além disso, observou-se que 56,1% dos isolados de *Salmonella* exibiram multirresistência antimicrobiana.

Todos os isolados de *Salmonella* apresentaram pelo menos um dos genes de resistência estudados (*bla*CTX, *tet*B, *sul*2 e *flo*R). A elevada positividade de *Salmonella* multidroga resistente associada à elevada presença de genes de resistência nas amostras de tilápia demonstra o potencial desses peixes contaminados servirem como meio de transmissão de *Salmonella* spp. para os humanos e fonte para disseminação de resistência antimicrobiana.

Portanto, existe a necessidade de um melhor controle da qualidade do pescado para diminuir a contaminação com *Salmonella* spp., como a introdução de programas de monitoramento da segurança microbiológica em sistemas de produção de tilápia e o uso racional de antimicrobianos na produção aquícola. Para os consumidores, a conscientização sobre não consumir a tilápia crua e aplicar técnicas de higiene durante a manipulação desse alimento podem ajudar na prevenção da transmissão zoonótica de *Salmonella* através do consumo de tilápia fresca.

REFERÊNCIAS

- ADESIJI, Y.; VIJAY KUMAR, D.; KARUNASAGAR, I. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 436–442, 2014.
- AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 780–788, 2012.
- ANTUNES, P. *et al.* Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 836–839, 2005.
- ANTUNES, P. *et al.* Salmonellosis: The role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**, p. 171, 2012.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**, p. 81, 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos**, p. 49, 2018.
- ARAÚJO, Y. F. **Avaliação da qualidade da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gelo de manutenção comercializados na cidade de Brasília, Distrito Federal**. TCC, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, 2015.
- ASTEN, A. J. A. M.; DIJK, J. E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella*

spp. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251–259, 2005.

AWUOR, W. S.; MIRUKA, O. D.; ELIUD, W. N. Characterisation of *Salmonella* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) along lake Victoria Beaches in Western Kenya. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 56, n. 8, p. 1397–1402, 2011.

BANIGA, Z. *et al.* Prevalence and characterisation of *Salmonella* Waycross and *Salmonella enterica* subsp. *salamae* in Nile perch (*Lates niloticus*) of Lake Victoria, Tanzania. **Food Control**, v. 100, p. 28–34, 2019.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2013.

BARTOLOMEU, D. A. *et al.* Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, p. 21–30, 2011.

BEKELE, B.; WORKAGEGN, K.; NATARAJAN, P. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogenic bacteria in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **International Journal of Aquaculture and Fishery Sciences**, v. 5, n. 4, p. 022–026, 2019.

BORGES, A. M.; BERTHIER, F. M. Secretaria de Estado de Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Criação de tilápias**. 3. ed. Brasília: Emater-DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**. 1aed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente (Atualizado em 02/10/2017)**, 2017.

BRASIL. Distrito Federal. Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 DE 15/12/2014. **Aprova o**

regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999. Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, estados, municípios e Distrito Federal, na área de epidemiologia e controle de doenças, define a sistemática de financiamento e dá providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 dez. 1999. p. 30.

BRASIL. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal. **Cooperativa de produtores assume gestão do Mercado do Peixe.** 2020a. Disponível em: <http://emater.df.gov.br/cooperativa-de-produtores-assume-gestao-do-mercado-do-peixe/>. Acesso em: 31/08/2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020. **Proíbe em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina,** 2020b.

BRCast - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Manual Antibiograma 2019.** Brasi: Laborclin, 2019. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: 11 out. 2020.

BRENNER, F. W. *et al.* *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465–2467, 2000.

BUDIATI, T. *et al.* Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. **Aquaculture**, v. 372–375, p. 127–132, 2013.

BYRNE-BAILEY, K. G. *et al.* Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 696–702, 2009.

CANONICO, G. C. *et al.* The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 15, n. 5, p. 463–483, 2005.

CARDOSO, M. M. L. **História da vida de tilápias e influência para pesca e estado trófico em lagos e reservatórios tropicais**. 2016. 161 f. Tese (Doutorado em Ecologia), Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Public Health Image Library, (PHIL)**, 2019. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23250>

CHAKROUN, I. *et al.* Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical *Salmonella* Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 40–49, 2017.

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI supplement M100, 2020.

COHEN, E. *et al.* Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant *Salmonella enterica* in poultry. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 413–432, 2020.

CORTÉS-SÁNCHEZ, A. D. J.; ESPINOSA-CHAURAND, L. D. Foods, fish and salmonellosis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 23, p. 525–535, 2018.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45, 2017.

COSTA, T.; VIDAL, A.; VAZ, A. Pesquisa de *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. isoladas de tilápias (*Oreochromis* spp.) obtidas de pesque-pagues no interior do estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 31, p. 93, 2015.

CROFTS, T. S.; GASPARRINI, A. J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 422–434,

2017.

DANTAS FILHO, J. V. *et al.* Cadeia do pescado: *Salmonella* spp. como agente contaminante. **Revista Ciência e Saúde Animal**, v. 2, p. 49–68, 2020.

DRAEGER, C. L. *et al.* Brazilian foodborne disease national survey: evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy, and practice in public health. **Nutrients**, v. 40, n. 11, p. 2–20, 2019.

EFSA. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis. **EFSA Supporting Publications**, v. 14, n. 3, 2017.

ELHADI, N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 3, 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tilápia em laboratório**, 2015.

ESPOSTO, E. M. *et al.* Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 144–148, 2007.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Perspectives in medicinal chemistry antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, p. 25–64, 2014.

FARDSANEI, F. *et al.* Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 451–456, 2017.

FERNANDES, D. V. G. S. *et al.* *Salmonella* spp. In the fish production chain: A review. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, 2018.

FITCH, F. M. *et al.* β -Lactam resistance genes: characterization, epidemiology, and first detection of blaCTX-M-1 and blaCTX-M-14 in *Salmonella* spp. isolated from poultry in Brazil

- Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 2, p. 164–171, 2016.

FRASER, A. *et al.* Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 11, p. 970–976, 2006.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 29–45, 2014.

GHAFOURIAN, S. *et al.* Extended Spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 17, p. 11–21, 2015.

GRIMONT, P.; WEILL, F.-X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, 2007.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 4, p. 1-24, 2016.

HELKE, K. L. *et al.* Effects of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne salmonellosis in humans: A systematic literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 472–488, 2017.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 250-255, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2018**, v. 46, p. 1–8, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2019**, v. 47, p. 1–8, 2019.

IGARASHI, M. A. Aspectos tecnológicos e perspectivas de desenvolvimento do cultivo de tilápia no Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 21, n. 3, p.

123–130, 2019.

JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.

JARA, M. Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 22, n. 1–2, p. 49–55, 2010.

KADHIM, H. M. Review of pathogenicity and virulence determinants in *Salmonella*. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 14, n. 1, p. 377–381, 2020.

KENNETH J. RYAN; RAY, G. **Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases**. 4^a ed ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

KOONSE, B. *et al.* *Salmonella* and the sanitary quality of aquacultured shrimp. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2527–2532, 2005.

LEONÍDIO, A. R. A. *et al.* Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 8, n. 15, p. 574–614, 2015.

LERMA-FIERRO, A. G. *et al.* Microbiological evaluation of minimally processed and marketed fish in popular market of the city of Tepic Nayarit, Mexico: Sanitary quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Tropicultura**, v. 38, n. 2, p. 1–19, 2020.

LI, R. *et al.* Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 14–18, 2013.

LIMA, T. A. S. *et al.* Limites máximos de resíduo de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Anvisa**, p. 136, 2018.

LU, J. *et al.* Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p.

127, 2018.

LUNESTAD, B. T. *et al.* *Salmonella* in fish feed; occurrence and implications for fish and human health in Norway. **Aquaculture**, v. 265, n. 1, p. 1–8, 2007.

MAKA, Ł. *et al.* Resistance to sulfonamides and dissemination of sul genes among *Salmonella* spp. isolated from food in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 383–389, 2015.

MAKA, Ł.; POPOWSKA, M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 67, n. 4, p. 343–358, 2016.

MARCH, M. DE F. B. P. Resistência antimicrobiana do pneumococo aos antibióticos beta-lactâmicos. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 3, p. 9–13, 2013.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, 131 p., 2016.

MERINO, L. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, p. 530–540, 2019.

MICHAEL, G. B. *et al.* Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898–1914, 2006.

MILANEZ, A. Y. *et al.* Potencial e barreiras para a exportação de carne de tilápias pelo Brasil. **BNDES Set.**, v. 25, n. 49, p. 155–213, 2019.

NAIR, D. V. T.; VENKITANARAYANAN, K.; KOLLANOOR JOHNY, A. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 2-24 2018.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Review**

of **Medicine**, v. 52, n. 1, p. 259–274, 2001.

OIE - World Organization for Animal Health. **OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Paris.** EUA: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/a-oie-list-antimicrobials-july2019.pdf>.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.

PARRY, C. M.; THRELFALL, E. J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 531–538, 2008.

PEREIRA-MAIA, E. C. *et al.* Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PUI, C. F. *et al.* Review Article *Salmonella*: A foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 465–473, 2011.

RIBEIRO, C. R. N.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. Utilização racional de antimicrobianos na clínica veterinária. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2018.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195–203, 2005.

RODRIGUES, D. P. Salmoneloses aviárias e saúde pública. **ANAIS DO 19º SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA E 10º BRASIL SUL POULTRY FAIR**, v. 89, p. 98, 2018.

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

SABBAGH, S. C. *et al.* So similar, yet so different: Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. **FEMS Microbiology**

Letters, v. 305, n. 1, p. 1–13, 2010.

SANTOS, R. R. D. **Ocorrência, tipagem molecular e capacidade de colonização de amostras de *Salmonella enterica* em peixes nativos.** Belo Horizonte: UFMG, 2015. 86 p. Tese (Doutor em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. T. V. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva da tilápia. **Texto para discussão. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**, 2017.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.

SILVA, F. V. E. *et al.* Características morfológicas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-nilo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1407–1412, 2009.

SILVA, N. C. S. L. *et al.* Gene floR and resistance to florfenicol in isolated *Aeromonas* spp. indigenous aquatic organisms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 357–366, 2018.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 3, p. 155–160, 2000.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 131–149, 2011.

SUSSEL, F. R. Tilapicultura no Brasil e entraves na produção. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**, n. Figura 1, p. 1–6, 2013.

SYKES, R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1842–1852, 2010.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of**

Medicine, v. 119, n. 6, p.3-10, 2006.

THAI, T. H. *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from meat shops at the markets in North Vietnam. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 11, p. 986–991, 2012.

THONG, K. L.; MODARRESSI, S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. **Food Research International**, v. 44, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CAE, C. L.; **Microbiologia**. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 964 p., 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6^a ed. São Paulo: Livraria Attheneu, 912 p., 2015.

TRAORÉ, O. *et al.* Prevalence and diversity of *Salmonella enterica* in water, fish and lettuce in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

WEBBER, B. *et al.* *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. **Ciência Rural**, v. 49, n. 7, p. e20181022, 2019.

WHO. World Health Organization. **Global action plan on antimicrobial resistance**, 2015.

WHO. World Health Organization. **WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (WHO CIA list)**. World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325036>.

WHO. World Health Organization. **Code of Practice for fish and fishery products**. Food & Agriculture Org., 2020.

XIE, X. *et al.* Trends in sensitive detection and rapid removal of sulfonamides: A review. **Journal of Separation Science**, p. 1–81, 2020.

YANG, X. *et al.* Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. **Food Control**, v. 57, p. 308–313, 2015.

ZHANG, C.-Z. *et al.* The emergence of chromosomally located bla (CTX-M-55) in *Salmonella* from foodborne animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serovars in retail aquaculture products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 47–52, 2015.

ZHU, Y. *et al.* Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 43–51, 2017.

ZISHIRI, O. T.; MKHIZE, N.; MUKARATIRWA, S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from south Africa and Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2016.

ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
 Volume XX, Number XX, 2021
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/fpd.2021.0010

Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. in Aquacultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Commercialized in Federal District, Brazil

Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira, Sabrina Lunara Santos Pavelquesi, Erika da Silva Monteiro, Letícia Fernandes Silva Rodrigues, Calliandra Maria de Souza Silva, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, and Daniela Castilho Orsi¹

Abstract

This study aimed to assess *Salmonella* spp. prevalence in aquaculture Nile tilapia commercialized in the Federal District, Brazil, and determine the antimicrobial resistance profile of the isolates. Fifty-seven *Salmonella* spp. strains were isolated from 101 samples of fresh tilapia fillets collected in the Federal District, Brazil. These isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing by the Kirby–Bauer disk diffusion method and analyzed for the presence of *bla*CTX, *tet*B, *sul*2, and *flo*R resistance genes. The *Salmonella* spp. prevalence in fresh tilapia fillets was 45.5%; that is, 46 of 101 samples were positive for the *InvA* gene. The antimicrobial resistance profile showed high resistance rates for amoxicillin/clavulanic acid (87.7%), tetracycline (82.5%), sulfonamide (57.9%), and chloramphenicol (26.3%). Additionally, 56.1% of *Salmonella* spp. isolates were multidrug-resistant (MDR) isolates. The beta-lactam-resistant gene *bla*CTX was identified in 66.7% of isolates, the tetracycline resistance gene *tetA* in 54.4%, and the chloramphenicol resistance gene *flo*R in 50.9%, while the sulfonamide resistance gene *sul*2 was present in 49.1%. The results revealed that tilapia fillets were highly contaminated with MDR *Salmonella*. These *Salmonella* spp. strains carried multiple antimicrobial resistance genes, which might facilitate their dissemination to consumers along the production chain. Hence, there is an evident need to control *Salmonella* in fish production systems to ensure public health.

Keywords: tilapia fillets, freshwater fish, resistance genes, multidrug-resistant *Salmonella*

Introduction

TILAPIA IS THE second most farmed freshwater fish worldwide, after carps (FAO, 2018). Today, all commercially important tilapia outside of Africa belong to the genus *Oreochromis*, and more than 90% of these farmed fish are Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Wang and Lu, 2015). In Brazil, strong consumer demand and continuous investments in the tilapia farming sector have resulted in continued production growth, with 311,500 tons produced in 2018, corresponding to 60% of the Brazilian aquaculture fish production (IBGE, 2018). Tilapia is considered one of the most accepted fish in the consumer market due to its attractive characteristics, such as white and tasty fillets (Barroso *et al.*, 2019).

In recent years, tilapia fillet consumption has increased significantly in Brazil. Simultaneously, this food's safety, particularly related to microbiological contamination, has

become a source of concern. *Salmonella* spp. is not part of the healthy fish microbiota, and its presence indicates fecal contamination either from polluted water or cross-contamination during the production chain (Wang and Lu, 2015; Fernandes *et al.*, 2018). *Salmonella* spp. is one of the most widespread, zoonotic foodborne pathogens worldwide (Heredia and García, 2018; Draeger *et al.*, 2019). In Brazil, *Salmonella* spp. is the second most prevalent foodborne pathogen, while *Escherichia coli* is the first (Draeger *et al.*, 2019). The European Union reports salmonellosis as the second most prevalent zoonosis, after campylobacteriosis (Pepe *et al.*, 2009; EFSA and ECDC, 2021). Therefore, the presence of *Salmonella* spp. in tilapia may represent a reason for an increasing number of enteric disease outbreaks (Heredia and García, 2018). Nevertheless, the prevalence of the gastrointestinal pathogen *Salmonella* in fish in Brazil is seldom reported in the literature (Fernandes *et al.*, 2018).

¹Laboratory of Food Control, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil.
 ORCID ID (<https://orcid.org/0000-0001-7325-9871>).

The expanding antimicrobial resistance in foodborne pathogens, such as *Salmonella* spp., has caused a significant increase in public health safety concerns. The rise in resistant strains has been attributed to the inappropriate use of antimicrobial agents in human and veterinary medicine and their usage as growth promoters in animal production. This acquired antimicrobial resistance can be further transmitted to the human population through the food chain. Considering that multiresistant strains of *Salmonella* spp. have been isolated from different animal-origin foods worldwide, expanding resistance poses a serious threat to public health (Yang *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2018).

According to McMillan *et al.* (2019), *Salmonella* spp. can carry genes encoding resistance to several classes of antimicrobials, including β -lactams, tetracyclines, sulfonamides, and phenicols. The authors reported that a diverse group of plasmids present in strains of *Salmonella enterica* isolated from food animals, carrying antimicrobial resistance genes, is responsible for its phenotypic resistance. The antimicrobial resistance transfer ability between bacteria on mobile genetic elements can cause the rapid establishment of multidrug resistance in bacteria from animals, thus creating a foodborne risk to human health.

Few studies in Brazil have focused on *Salmonella* prevalence in tilapia and on its antimicrobial resistance characterization. Thus, this study evaluated *Salmonella* spp. prevalence in fresh tilapia fillet samples collected in the Federal District, Brazil, and determined the isolates' antimicrobial susceptibility and the presence of *bla*CTX, *tet*B, *sul*2, and *flo*R resistance genes.

Materials and Methods

Sample collection, *Salmonella* isolation, and biochemical confirmation

From March 2018 to March 2020, 101 samples of fresh tilapia filets were collected from different supermarkets in the Federal District, Brazil. These fish came from several Brazilian states (Paraná, São Paulo, Rondônia, Santa Catarina, Minas Gerais, and Federal District). Samples were stored in an icebox and immediately transported to the laboratory and analyzed within 2 h.

Salmonella strains were isolated as described in the Technical Guide for Laboratory Detection of *Salmonella* spp. (Brasil, Ministério da Saúde, 2011). For *Salmonella* spp. detection, in triplicate, 25 g of each sample was transferred into 225 mL of buffered peptone water (BPW; Kasvi, Brazil), homogenized, and incubated at 37°C for 18–20 h. Then, 1.0 mL each of the pre-enrichment BPW aliquots was transferred into 10 mL of tetrathionate broth (Himedia) and selenite cystine broth (Acumedia), respectively, and incubated at 37°C for 24 h. A loopful (10 μ L) of enriched broth was streaked onto the xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (Himedia) and *Salmonella* Shigella (SS) agar (Himedia) and incubated at 37°C for 24 h. Presumptive *Salmonella* colonies in XLD and SS agars were confirmed biochemically using triple sugar iron (TSI) agar (Himedia) and lysine iron agar (LIA; Himedia) slants. These slants were incubated at 37°C for 24 h. The presumptive *Salmonella* isolates, tested positive on TSI and LIA biochemical testing, were confirmed by amplifying a targeted *Salmonella*-specific invasive (*invA*) gene by polymerase chain reaction (PCR; Table 1).

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed following the standard Kirby–Bauer disk diffusion method as per Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRCAST, 2019) guidelines. The bacterial inoculum was obtained from a microbial growth suspension in Mueller–Hinton broth with turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard (1.0×10^8 CFU/mL), adjusted to an optical density between 0.08 and 0.10 at 625 nm using a spectrophotometer (BRCAST, 2019). All the antimicrobial disks were purchased from Newprov (Brazil). The analyzed antimicrobial agents' concentrations and abbreviations are as described: amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 μ g), ceftazidime (CAZ, 30 μ g), cefotaxime (CTX, 30 μ g), gentamicin (GEN, 10 μ g), chloramphenicol (CLO, 30 μ g), tetracycline (TET, 30 μ g), imipenem (IMP, 10 μ g), sulfonamide (SUL, 300 μ g), and ciprofloxacin (CIP, 5 μ g). The isolates were classified as susceptible (S), intermediate (I), or resistant (R), according to the CLSI guidelines for *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2020). *Salmonella* isolates resistant to three or more antimicrobials were defined as multidrug-resistant (MDR) isolates.

Salmonella molecular confirmation and antimicrobial resistance gene detection by PCR

The *InvA* gene PCR amplification confirmed the biochemically presumptive *Salmonella* isolates. The confirmed strains ($n = 57$) were then screened, by PCR, for the presence of antimicrobial resistance genes: *bla*CTX for beta-lactams, *tet*B for tetracycline, *sul*2 for sulfonamide, and *flo*R for chloramphenicol.

For DNA extraction, the biochemically identified *Salmonella* isolates were cultivated overnight in Mueller–Hinton broth and their DNA was extracted by employing the NucleoSpin Food[®] kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany), as per the manufacturer's instructions. The DNA concentrations were then determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh), and DNA integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Table 1 shows the primer sequences and PCR conditions used to amplify the virulence gene *InvA* and the resistance genes, *bla*CTX, *tet*B, *sul*2, and *flo*R. All PCRs were performed in a 25- μ L final volume reaction mixture containing 2.5 μ L of PCR buffer; 0.7 μ L of MgCl₂; 1.5 μ L of dNTP (2.5 mM); 0.5 μ L of Taq DNA polymerase; 1.5 μ L of each primer, forward and reverse; and 18.3 μ L of Milli-Q water. These thermal cycling reactions were conducted with Techne TC-512 thermal cycler (Bibby Scientific, Inc.), and each PCR run included negative and reagent controls. The reagent control consisted of all PCR components except for the DNA template. The amplified DNA was separated by electrophoresis at 100 V for 50 min in 1.5% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. A 100 bp DNA ladder was used as a molecular weight marker.

Results

Salmonella spp. prevalence in fresh tilapia filets

Salmonella spp. prevalence was 45.5%, that is, 46 of 101 samples of fresh tilapia filets analyzed presented this bacterium confirmed by *invA* gene detection.

PREVALENCE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF SALMONELLA IN TILAPIA

3

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES AND POLYMERASE CHAIN REACTION CONDITIONS USED TO AMPLIFY THE VIRULENCE GENE *invA* AND THE RESISTANCE GENES, *blaCTX*, *tetB*, *sul2*, AND *floR*

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Product size (bp)	PCR amplification conditions	Reference
<i>invA</i>	CATTGGTGATGGTCTTGTCG CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG	298	Denaturation for 2 min at 95°C, followed by 35 cycles for 1 min at 95°C, annealing for 1 min at 60°C, and a final extension for 1 min at 72°C	Cruz <i>et al.</i> (2019)
<i>blaCTX</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA AGTGACCAGAATCAGCGG	585	Denaturation for 5 min at 94°C, followed by 30 cycles for 30 s at 94°C, annealing for 30 s at 55°C, 50 s at 72°C, and a final extension for 7 min at 72°C	Li <i>et al.</i> (2013)
<i>tetB</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCAATAACACCG	659	Denaturation for 5 min at 94°C, followed by 34 cycles for 25 s at 94°C, annealing for 30 s at 55°C, 50 s at 72°C, and a final extension for 7 min at 72°C	Zishiri <i>et al.</i> (2016)
<i>sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTTGATACCGGCACCCGT	285	Denaturation for 10 min at 95°C, followed by 35 cycles for 45 s at 94°C, annealing for 50 s at 55°C, 50 s at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C	Zhu <i>et al.</i> (2017)
<i>floR</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT ATGCAGAAGTAGAACCGG	868	Denaturation for 5 min at 94°C, followed by 30 cycles for 30 s at 94°C, annealing for 30 s, 1 min at 72°C, and a final extension for 5 min at 72°C	Thai <i>et al.</i> (2012)

PCR, polymerase chain reaction.

Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolates

Figure 1 shows the antimicrobial resistance profile of 57 *Salmonella* isolates. Overall, only 5.3% (3/57) of isolates were susceptible to all tested antimicrobials and 38.6% (22/57) were resistant to one or two antimicrobials, while 56.1% (32/57) presented multidrug resistance (Table 2). High resistance rates were observed for amoxicillin/clavulanic acid (87.7%, 50/57), tetracycline (82.5%, 47/57), sulfonamide (57.9%, 33/57), and chloramphenicol (26.3%, 15/57), whereas lower resistance rates were found for ciprofloxacin (1.8%), imipenem (1.8%), ceftazidime (3.5%), and cefotaxime (3.5%). Notably, all the isolates were susceptible to gentamicin.

Mainly, 12 resistance patterns of *Salmonella* isolates were detected, as seen in Table 3. The dominant resistance pattern

was SUL AMC TET (24.6%, 14/57), followed by AMC TET (21.1%, 12/57) and SUL AMC TET CLO (17.5%, 10/57).

Antimicrobial resistance genotypes of *Salmonella* isolates

Antimicrobial resistance genes were screened in all 57 *Salmonella* isolates and 66.7% (38/57) presented the *blaCTX* gene associated with resistance to beta-lactams, 54.4% (31/57) presented the *tetB* gene associated with resistance to tetracycline, 49.1% (28/57) presented the *sul2* gene associated with resistance to sulfonamide, and 50.9% (29/57) presented the *floR* gene associated with resistance to chloramphenicol (Table 4). Resistance genes were also detected in phenotypically susceptible and intermediate

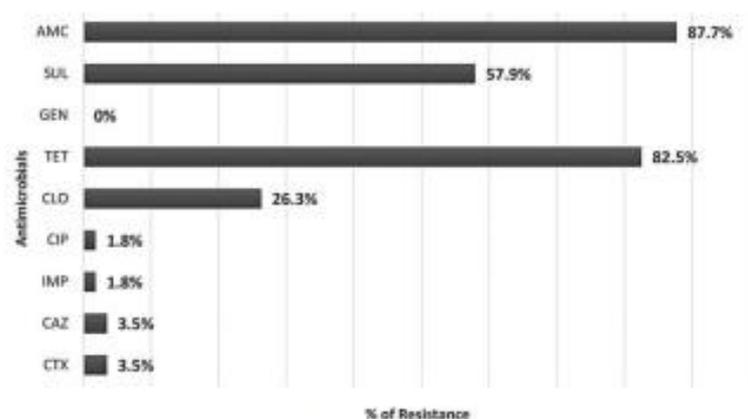


FIG. 1. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolates.

TABLE 2. ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND MULTIDRUG RESISTANCE PROFILE OF *SALMONELLA* ISOLATES

No. of antimicrobials with resistance	Number and percentage of isolates	
	n	%
0	3	5.3
1	5	8.8
2	17	29.8
3	19	33.3
4	11	19.3
5	2	3.5
Total	57	100
MDR (sum of 3, 4, and 5)	32	56.1

MDR, multidrug-resistant.

isolates (Table 4), *blaCTX* in 8.8% (4/38), *tetB* in 7.0% (4/31), and *sul2* in 15.8% (8/28), whereas *floR* was detected in 31.6% (18/29).

Table 5 displays the various resistance gene patterns found in each of the *Salmonella* isolates. All 57 *Salmonella* strains in this study, including those susceptible to all antimicrobials, had at least one of the resistance genes tested in their genome. The isolated *Salmonella* registered 15 distinct genotype resistance profiles, indicating considerable resistance gene pattern diversity.

Discussion

Salmonella spp. prevalence in fresh tilapia fillets commercialized in Federal District, Brazil, was 45.5%; that is, 46 samples were unfit for consumption according to the Brazilian legislation, which prohibits the *Salmonella* spp. presence in fish (Brasil, Agência Nacional Vigilância Sanitária, 2019). Other studies also reported high rates of tilapia contamination with *Salmonella*. Budiati *et al.* (2013) isolated *Salmonella* spp. from 43.8% (14/32) of the tilapia samples obtained from Malaysia. Elhadi (2014) reported a 64.9% *Salmonella* spp. prevalence in tilapia imported from Thailand and 28.0% prevalence in those imported from India. Seel *et al.* (2016) found that of 20 fresh tilapia samples collected in different

TABLE 3. ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS OF *SALMONELLA* ISOLATES

Resistant phenotypes	n	%
1 CAZ AMC CTX TET CLO	1	1.8
2 SUL CAZ AMC CTX TET	1	1.8
3 SUL AMC TET CLO	10	17.5
4 SUL IMP AMC TET	1	1.8
5 AMC TET CLO	4	7.0
6 SUL AMC TET	14	24.6
7 SUL CIP AMC	1	1.8
8 AMC TET	12	21.1
9 SUL AMC	2	3.5
10 SUL TET	3	5.3
11 AMC	4	7.0
12 SUL	1	1.8

AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CLO, chloramphenicol; CTX, cefotaxime; GEN, gentamicin; IMP, imipenem; SUL, sulfonamide; TET, tetracycline.

TABLE 4. PRESENCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES SCREENED FROM 57 *SALMONELLA* ISOLATES

Resistance genes	Antimicrobial resistance profile			
	R n (%)	S n (%)	I n (%)	Total n (%)
<i>blaCTX</i>	33 (57.9)	1 (1.8)	3 (7.0)	38 (66.7)
<i>tetB</i>	27 (47.4)	2 (3.5)	2 (3.5)	31 (54.4)
<i>sul2</i>	19 (33.3)	6 (10.5)	3 (5.3)	28 (49.1)
<i>floR</i>	11 (19.3)	14 (24.6)	4 (7.0)	29 (50.9)

Bangladesh markets, 75% (15/20) were positive for *Salmonella* spp. Lerma-Fierro *et al.* (2020) also detected *Salmonella* spp. in 41.7% (5/12) of fresh Nile tilapia filets marketed in Tepic Nayarit city, Mexico.

Similar to our study, Zishiri *et al.* (2016) used the *invA* gene to confirm *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens in South Africa and Brazil. The invasion A gene (*invA*) is a well-known virulence gene in *Salmonella*, which is responsible for host invasion. This gene located in *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) is conserved in all *Salmonella* serovars. Consequently, researchers use it as a marker to detect *Salmonella* isolated from different sources (Zishiri *et al.*, 2016).

This study demonstrated a high incidence of resistance to amoxicillin/clavulanic acid (87.7%), tetracycline (82.5%), and sulfonamide (57.9%) in *Salmonella* isolates. These results were comparable with findings of Elhadi (2014), in which the highest antimicrobial resistance was for tetracycline (90%) and amoxicillin/clavulanic acid (45%) in *Salmonella* spp. isolated from freshwater fish imported by the eastern province of Saudi Arabia. Zhang *et al.* (2015) reported high resistance to sulfonamides (56.5%) and tetracycline (34.1%) in *Salmonella* serovars isolated from retail aquaculture products in China. The resistance to chloramphenicol (26.3%) observed in our study was similar to findings of Budiati *et al.* (2013), in which *Salmonella* isolates were resistant to chloramphenicol (37.2%) and tetracycline (67.4%). Furthermore, MDR *Salmonella* spp. was often found in our study (56.1%). Yang *et al.* (2015) and Zhang

TABLE 5. ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENOTYPE PATTERNS OF *SALMONELLA* ISOLATES

Resistance genes	n	%
1 <i>blaCTX, tetB, sul2, floR</i>	5	8.8
2 <i>blaCTX, sul2, floR</i>	5	8.8
3 <i>blaCTX, tetB, floR</i>	4	7.0
4 <i>blaCTX, tetB, sul2</i>	2	3.5
5 <i>tetB, sul2, floR</i>	4	7.0
6 <i>blaCTX, floR</i>	7	12.3
7 <i>blaCTX, sul2</i>	3	5.3
8 <i>blaCTX, tetB</i>	5	8.8
9 <i>tetB, floR</i>	1	1.8
10 <i>tetB, sul2</i>	5	8.8
11 <i>sul2, floR</i>	1	1.8
12 <i>blaCTX</i>	6	10.5
13 <i>TetB</i>	4	7.0
14 <i>sul2</i>	3	5.3
15 <i>floR</i>	2	3.5
Total	57	100

et al. (2015) reported 34.0% and 43.3%, respectively, of MDR *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. This increased antimicrobial resistance of *Salmonella* may limit therapeutic options for treating salmonellosis in humans and animals (Elhadi, 2014; Heredia and García, 2018).

Among the 87.7% (50/57) isolates of *Salmonella* resistant to amoxicillin/clavulanic acid, 57.9% (33/57) presented the resistance gene *bla*CTX. Studies have exposed a wide range of beta-lactamase genes occurring in *Salmonella*. Moreover, among *Enterobacteriaceae*, including *Salmonella*, the *bla*CTX gene is the most widespread beta-lactamase-resistant gene and is mainly associated with a diverse set of transmissible plasmids (Zhang *et al.*, 2019).

In this study, 47.4% (27/57) of the 82.5% (47/57) isolates of *Salmonella* phenotypically resistant to tetracycline presented the resistance gene *tetB*. According to Zishiri *et al.* (2016), *tetA* and *tetB* are the most common genes found in tetracycline-resistant *Salmonella* isolates. These genes are responsible for encoding efflux pumps associated with plasmids, transposons, or both and are often conjugative, highlighting the potential transference of these genes to other bacteria, environment, animals, and humans (Mąka and Popowska, 2016).

The resistance gene *sul2* was present in 33.3% (19/57) of the 57.9% (33/57) isolates of *Salmonella* phenotypically resistant to sulfonamide. The two most frequently found genes among sulfonamide-resistant isolates are *sul1* and *sul2*, both encode forms of dihydropteroate synthase whose product has a low affinity for sulfonamides. The *sul1* gene is regularly linked to other resistance genes in class 1 integrons, while the *sul2* gene is usually associated with small multicopy plasmids or large, transmissible multiresistance plasmids (Mąka *et al.*, 2015).

Among the 26.3% (15/57) of *Salmonella* isolates phenotypically resistant to chloramphenicol, 19.3% (11/57) had the resistance gene *floR*. This gene has been identified mainly in Gram-negative bacteria and is responsible for encoding drug efflux pumps. It has been identified on both chromosomes and plasmids, often associated with mobile genetic elements and genomic islands (Lu *et al.*, 2018).

Our study also detected resistant genes in phenotypically susceptible and intermediate isolates. Curiously, the *floR* gene was more prevalent in phenotypically susceptible and intermediate isolates than in resistant isolates. According to Adesiji *et al.* (2014), some antimicrobial-resistant genes are silent in bacteria *in vitro* and can spread to other bacteria or turn on *in vivo*, especially under the selective pressure of antibiotic use.

The extensive use of antimicrobials in animal production systems for controlling bacterial infections and growth promotion has contributed to the development of drug-resistant bacteria. The fecal excretion of antibiotic-resistant pathogens such as *Salmonella* from livestock and poultry causes water system contamination. Aquaculture isolates have shown similar resistance patterns to the isolates recovered from terrestrial agriculture, indicating that the water source contamination comes from farmland (Nair *et al.*, 2018). According to Wang and Lu (2015), integrated fish farming involves raising fish alongside livestock, and aquatic environment and product investigations revealed an increase of pathogens, such as *Salmonella*, in the water and intestine of tilapia in these cases.

Conclusions

This study revealed a high *Salmonella* spp. prevalence in fresh tilapia fillets collected in the Federal District, Brazil. Furthermore, these *Salmonella* isolates frequently exhibited multidrug resistance patterns, and antimicrobial resistance genes, *bla*CTX, *tetB*, *sul2*, and *floR*, were also prevalent among them. This high *Salmonella* spp. occurrence in fresh tilapia fillets indicates the need for programs to monitor microbiological safety in tilapia production systems and rational use of antimicrobials in aquaculture production to reduce the risk of developing and spreading antimicrobial resistance.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES - Finance Code 001), by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF - Edital 3/2018), and by UnB (Edital DPG 0004/2021).

References

- Adesiji YO, Deekshit VK, Karunasagar I. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. *Food Sci Nutr* 2014;2: 436–442.
- Barroso RM, Muñoz AEP, Cai J. Social and economic performance of tilapia farming in Brazil. FAO Fisheries and Aquaculture Circular no. 1181. Rome, FAO. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IG, 2019.
- Brasil, Agência Nacional Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Establish the lists of microbiological standards for foods. 2019. Available at: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view> accessed November 5, 2020.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella* spp. 1th Edition, Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- [BRCAST] Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disc-diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. 2019. Available at: <http://brcast.org.br/documentos/> accessed March 5, 2021.
- Budiati T, Rusul G, Wan-Abdullah WN, Arip YM, Ahmad R, Thong KL. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. *Aquaculture* 2013;372:127–132.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. Wayne: CLSI M100, 2020.
- Cruz MRG, Leite YJBS, Marques JL, Pavelquesi SLS, Oliveira LRA, Silva ICR, Orsi DC. Microbiological quality of minimally processed vegetables commercialized in Brasília, DF, Brazil. *Food Sci Technol* 2019;39(Suppl. 2):498–503.
- Draeger CL, Akutsu RCCA, Zandonadi RP, da Silva ICR, Botelho RBA, Araújo WMC. Brazilian foodborne disease national survey: Evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy, and practice in public health. *Nutrients* 2019;40:2–10.

- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA J* 2021; 19:1–283.
- Elhadi N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014;4:234–238.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tilapia markets and producers diversifying as traditional large players lag. *Globefish—Analysis and information on world fish trade*. 2018. Available at: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1156017> accessed June 22, 2020.
- Fernandes DVGS, Castro VS, da Cunha Neto A, Figueiredo EES. *Salmonella* spp. in the fish production chain: A review. *Cienc Rural* 2018;48:1–11.
- Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr* 2018;4:250–255.
- [IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. 2018. Available at: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf accessed July 25, 2020.
- Lerma-Fierro AG, Flores-López MK, Guzmán-Robles ML, Cortés-Sánchez AJ. Microbiological evaluation of minimally processed and marketed fish in popular market of the city of Tepic Nayarit, Mexico sanitary quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Trop J* 2020;38 :1–19.
- Li R, Lai J, Wang Y, Liu S, Li Y, Liu K, Shen J, Wu C. Prevalence, and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int J Food Microbiol* 2013;163:14–18.
- Lu CJ, Zhang J, Xu L, Liu Y, Li P, Zhu T, Cheng C, Lu S, Xu T, Yi H, Li K, Zhou W, Li P, Ni L, Bao Q. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7:2–9.
- Mąka L, Maćkiw E, Ścieżyńska H, Modzelewska M, Popowska M. Resistance to sulfonamides and dissemination of sul genes among *Salmonella* spp. isolated from food in Poland. *Foodborne Pathog Dis* 2015;12:383–389.
- Mąka L, Popowska M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2016;67:343–358.
- McMillan EA, Gupta SK, Williams LE, Jové T, Hiott LM, Woodley TA, Barrett JB, Jackson CR, Wasilenko JL, Simmons M, Tillman GE, McClelland M, Frye JG. Antimicrobial resistance genes, cassettes, and plasmids present in *Salmonella enterica* associated with United States food animals. *Front Microbiol* 2019;10:1–18.
- Nair DVT, Venkitanarayanan K, Johnny AK. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods* 2018;7:3–24.
- Pepe T, Dominici R, Esposito G, Ventrone I, Fratamico PM, Cortesi ML. Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy. *J Food Prot* 2009;72:1718–1721.
- Seel SK, Kabir SML, Islam MA. Molecular detection and characterization of *Salmonella* spp. isolated from fresh fishes sold in selected Upazila markets of Bangladesh. *Bangl J Vet Med* 2016;14 :283–287.
- Yang X, Wu Q, Zhang J, Huang J, Chen L, Liu S, Yu S, Ca S. Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. *Food Control* 2015;57:308–313.
- Wang M, Lu M. Tilapia polyculture: A global review. *Aquac Res* 2015;1–12.
- Thai TH, Lan NT, Hirai T, Yamaguchi R. Antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from meat shops at the markets in North Vietnam. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9: 986–991.
- Zhang C-Z, Ding X-M, Lin X-L, Sun R-Y, Lu Y-W, Cai R-M, Webber MA, Ding H-Z, Jiang H-X. The emergence of chromosomally located blaCTX-M-55 in *Salmonella* from foodborne animals in China. *Front Microbiol* 2019; 10:1–8.
- Zhang J, Yang X, Kuang D, Shi X, Xiao W, Zhang J, Gu Z, Xu X, Men J. Prevalence of antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serovars in retail aquaculture products. *Int J Food Microbiol* 2015;210:47–52.
- Zhu Y, Lai H, Zou L, Yin S, Wang C, Han X, Xia X, Hu K, He L, Zhou K, Chen S, Ao X, Liu S. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *Int J Food Microbiol* 2017;259:43–51.
- Zishiri OT, Mkhize N, Mukaratirwa S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. *Onderstepoort J Vet Res* 2016;83: 1–11.

Address correspondence to:
 Daniela Castilho Orsi, PhD
 Laboratory of Food Control
 University of Brasilia (UnB)
 Centro Metropolitano
 Conjunto A, lote 01
 Ceilandia
 Brasilia CEP: 72220-900
 Federal District
 Brazil

E-mail: danielacastilhoorsi@gmail.com

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO



Manuscript Submission Guidelines and Policies for *Foodborne Pathogens and Disease*

Last updated 8/10/2021 2:28:08 PM

Journal Information

- Manuscript Submission Site: <https://mc.manuscriptcentral.com/foodborne>
- Editorial Office Contact: goilver@urk.edu
- Support Contact: pubsupport@liebertpub.com
- Journal Model: Hybrid (Open Access Option)
- Blinding: Single Blind
- File formatting requirement stage: Upon submission
- Instant Online Option (immediate publication of accepted version): No
- Submission Fee: \$49.00. The submission fee must be paid [here](#) before submitting the manuscript.
- Average time to initial decision: 37 days

About the Journal

The target audience for *Foodborne Pathogens and Disease* is the medical, veterinary, agricultural and research communities. The Journal will bridge the gap between these diverse groups. The scope of *Foodborne Pathogens and Disease* is comprehensive and includes topics such as: emerging foodborne pathogens; health problems/disease caused by foodborne pathogens; emergence of drug resistance in foodborne pathogens; methods and technology for rapid and accurate detection of foodborne pathogens; strategies to destroy or control foodborne pathogens in food production and processing environments; development of novel strategies for the prevention and control of plant and animal diseases that impact food safety; and dissemination of innovative foodborne pathogen/food safety educational materials. Several of the articles/topics will likely have political appeal as well. *Foodborne Pathogens and Disease* is a monthly peer-reviewed international journal that publishes original research articles and short communications on important new information on foodborne pathogens research and diseases caused by foodborne pathogens.

Foodborne Pathogens and Disease invites scientists from all countries to submit manuscripts to the Journal. Timely review articles and special reports on topics such as agroterrorism, food allergies, and the safety of organically grown and genetically modified foods are also within the Journal's purview. The Editor-in-Chief will invite authors to write review articles.

Manuscript Types and Guidelines

Original Research Articles	<ul style="list-style-type: none"> • 3,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 300 words • Maximum total of six (6) figures and/or tables
Review Articles	<p>Reviews are summaries of developments in the field. All reviews are subject to peer review. The Editor-in-Chief will make the invitation and ensure the quality of the review with the assistance of the editorial board.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 300 words • Maximum total of eight (8) figures and/or tables
Short Communications	<p>Short Communications are generally based on limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance. These articles must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 150 words • May include one figure OR table • Maximum of ten (10) references

Editorials and Commentaries	<p>Editorials and commentaries may be on any issue relevant to the field but must be brief and appropriately documented by data.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1,000-word limit • An abstract is not required • No tables or figures
Letters to the Editor	<ul style="list-style-type: none"> • 500-word limit • May include one figure OR table • Reference citations are identical in style to those of full original articles, but should not exceed five (5).

Word limits do NOT pertain to the abstract, disclosure statements, author contribution statements, funding information, acknowledgments, tables, figure legends, or references.

References

The references should be cited in the text using the name/date method [e.g., Keerthirathne et al. (2017)]. The reference list at the end of the manuscript should be organized alphabetically by name and year. Include the reference section as part of the main text file, not as a separate file. Use journal abbreviations as provided by PubMed/Medline. Provide the names of all authors for each reference. If references to personal communications or unpublished data are used, they are not to be in the list of references. They should be referred to in the text in parentheses: (AB Jones, personal communication). Include written permission from authors to cite unpublished data or articles still in press. Include among the references any articles that have been accepted but have not yet published; identify the name of publication and add "In Press." If the reference has been published online, provide the DOI number in place of the page range.

Sample style for references:

Journal article:

Besser JM, Carleton HA, Trees E, Stroika SG, Hise K, Wise M, Gerner-Smith P. Interpretation of whole-genome sequencing for enteric disease surveillance and outbreak investigation. *Foodborne Pathog Dis* 2019;16:504–512.

Book:

Wiedmann M, Zhang W, eds. *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Springer, 2011.

Chapter in a book:

Økstad O, Kolstø A. Genomics of *Bacillus* species, In: *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. Wiedmann M, Zhang W, eds. New York: Springer, 2011, pp. 29–53.

Other

Manuscript Text

Scientific names for species must appear with genus spelled in full on the first occurrence and abbreviated thereafter. Family names should appear on first occurrence of uncommon species. All microorganisms must be named by genus and species in accordance with the latest edition of *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, 9th ed., 1994.

Bacteriology

The name of the genus must appear in full the first time that the microorganism is cited in the abstract, in the body of the article, and in each table and figure legend. Thereafter, the genus can be abbreviated by its first initial unless it will be confused with other microorganisms cited in the manuscript, in which case each genus should be abbreviated to use enough letters to avoid confusion. The names of all microorganisms should be in italics. Specific strain designations and numbers should be used when appropriate. Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses.

General Manuscript Submission Guidelines and Policies for Mary Ann Liebert Journals

Last updated 9/10/2021 3:17:48 PM

Submission Preparation

All manuscripts must be prepared in accordance with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (icmje.org). Please consult your specific journal's requirements for additional information.

All Mary Ann Liebert, Inc. journals follow the standards, guidelines, and best practices set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE; publicationethics.org), the International Committee of Journal Medical Editors (ICJME; www.icmje.org), the World Medical Association (WMA); www.wma.net), and the American Medical Association (www.ama-assn.org).

Mary Ann Liebert, Inc. recommends that submissions follow standard relevant reporting guidelines. Please consult [The Equator Network](#) for more information.

Manuscript Structure

Specific journal requirements will vary, however the general order of elements in each manuscript should be

- Title page* with full manuscript title, all contributing authors' names and affiliations, a short running title, a denotation of the corresponding author, and a list of 4-6 keywords/search terms,
- Abstract,
- Main text without embedded figures or tables and with appropriate section headings, if applicable. Most research papers should be organized as follows: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions.
- Acknowledgments,
- Authorship confirmation statement,
- Author(s)' disclosure statement(s), even when not applicable,
- Funding statement, even when not applicable,
- References,
- Tables included in the text or as a separate document,
- Figure legends at the end of the main text or in a separate Word file,
- Figures uploaded as individual high-resolution files,
- Supplemental files uploaded as individual files.

*Double-blinded journals require a separate title page with the title, all contributing authors' names and affiliations, a denotation of the corresponding author, author acknowledgements, disclosures, and related identifying information.

Your individual journal may require

- An Institutional Review Board (IRB) approval (or waiver) statement and statement of patient consent as a separate paragraph after the methods section,
- Other relevant ethics attestations (see icmje.org for further guidance),
- Data sharing statement,
- Specific abstract and content sections, depending on manuscript type,

Manuscript Formatting

Please check your journal's requirements for file formatting. Many journals require formatting compliance only on revision; however, unless stated, the file formatting should comply with the following requirements on submission.

Manuscript Files

The main text file, figure legends, and tables should be prepared in Microsoft Word. Some journals may accept LaTeX. Please consult your individual journal instructions for guidance.

File Naming

- All file names should be in English and contain only alphanumeric characters.
- Do not include spaces, symbols, special characters, dashes, dots, or underscores.
- Title each file with the type of content contained in the file (e.g., manuscript.doc, tables.doc, FigureLegends.doc, Fig1.tif, SupplementalData.pdf, etc.).

Figures

- Submission of high resolution .TIFF or .EPS figure files is preferred. Please upload as individual files.
- Cite figures consecutively in text within parentheses
- Images should not reveal the name of a patient or a manufacturer

Figure Legends

- A legend should be provided for each supplied figure.
- All legends should be numbered consecutively.
- Figure legends may be included at the end of the main text file or uploaded as a separate, double-spaced Word file.
- In each legend, provide explanations for any abbreviations or symbols that appear in the figure.
- If the figure is taken from a copyrighted publication, permission must be secured by the author(s) and supplied at the time of submission with appropriate credit listed in the legend. Permissions and associated fees are the responsibility of the author.

Tables

- Tables may be included after the references at the end of the main text file, or uploaded as a single, separate Word file. All tables should be editable.
- Provide a title for each supplied table.
- Cite tables sequentially in text within parentheses.
- Explain abbreviations used in the body of the table in footnotes using superscript letters, not symbols.
- If a table is taken from a copyrighted publication, permission must be secured by the author(s) and supplied at the time of submission with appropriate credit listed in the legend. Permissions and associated fees are the responsibility of the author.

Supplemental Files

- Supplemental files should be uploaded as individual files. Most text, photo, graphic, and video formats are accepted. Ensure that patient identities are not revealed.
- Supplemental Information will not be copyedited or typeset; it will be posted online as supplied.
- For journals that publish accepted versions of papers prior to copyediting and typesetting, supplemental files will not be posted with the paper until after production has been completed.

Pre-Publication Policies

Funding

Upon manuscript submission, the submitting agent will have an opportunity to enter funding/grant information. If funding information is entered correctly, the publisher will deposit the funding acknowledgements from the article as part of the standard metadata to Funder Registry. The entered information should include funder names, funder IDs (if available), and associated grant numbers. Special care should be taken when entering this information to ensure total accuracy. Funding information must also be provided within the manuscript.

Government Funded Research / Funder Requirements

Mary Ann Liebert, Inc., adheres to national and international funder requirements. Various funders, such as the National Institutes of Health (NIH), Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute (HHMI), The Bill & Melinda Gates Foundation, and UK Research and Innovation (UKRI), have specific requirements for depositing the accepted version and/or the article of record version in a repository after an embargo period. Authors funded by these organizations should follow the self-archiving terms and conditions of these separate agreements based on the policies of the specific funding institutions. If you have questions, please [contact us](#) for more information.

Peer Review

All submissions are subject to peer review after initial editorial evaluation for suitability. A minimum of two reviews are required for most journals if the manuscript proceeds to the review stage. Final decisions on the manuscript are solely at the discretion of the Editor(s).

Exclusivity

Manuscripts should be submitted with the understanding that they have neither been published, nor are under consideration for publication elsewhere, in the same form or substantially similar form. Conference abstracts are excluded. If work was presented at a conference, supply the name, date, and location of the meeting as a footnote on the title page of the submission.

Third-party Submissions and Integrity

If a third party is submitting the manuscript, the submitting agent designation must be used, with the identity of the submitting agent disclosed. We reserve the right to reject any manuscript that does not contain this disclosure. The authors are solely responsible for any manuscript submitted on their behalf.

Confidentiality

Editors and reviewers must maintain strict confidentiality of manuscripts during the peer-review process. Sharing a manuscript in whole or in part, outside the scope of what is necessary for assessment, is impermissible prior to an accepted manuscript's official publication date. Reviewers are not permitted to contact authors directly.

Sharing of Materials

Authors must honor any reasonable request for materials, methods, or data necessary to reproduce or validate the research findings during peer review unless it violates the privacy or confidentiality of human research subjects.

Conflicts of Interest by the Editor-in-Chief and/or Section Editors

The Editor-in-Chief and Associate Editors will recuse themselves from participating in the review process of any manuscript in which there is a potential or actual competing interest.

Plagiarism

Mary Ann Liebert, Inc., is committed to maintaining the integrity of the peer-review process by upholding the highest standards for all published articles. All manuscripts will be processed through plagiarism detection. Plagiarized manuscripts will be rejected immediately.

Authorship

Authorship is defined by the International Committee of Medical Journal Editors in [Roles & Responsibilities](#). Contributors who do not meet all criteria for authorship should not be listed as authors, but they should be acknowledged in the Acknowledgments section with a description of their contribution to the work.

ORCID IDs

All submitting authors are required to complete their submissions using an ORCID identifier.

Corresponding Authors

One author should be designated as the corresponding author who will be responsible for communication between the authors and the journal editorial office and publisher. This individual will be responsible for ensuring all authors submit copyright forms, coordinating and responding to page proofs, and managing any other necessary contact during the peer review and production processes.

The submission system permits only one author to be identified as the corresponding author of record. However, we recognize that some submissions call for more than one corresponding author to be noted. In such cases, select one author to be the main point of contact for all communications regarding the peer review process of the paper, and on the title page of the manuscript, designate additional co-corresponding authors by including an asterisk after the authors' names in the byline. Include an accompanying footnote on the title page that reads, "Co-corresponding authors." Please ensure that the title page carries the full affiliation details and email address of any author who should be noted as a corresponding author. If the paper is accepted for publication, the full contact information for all designated co-authors will be listed at the end of the article as per usual journal style.

Changes in Authorship

Changes in authorship after submission or acceptance of a paper are generally not permitted, but the editorial leadership recognizes that in certain circumstances, it may be required. The policy for such cases is as follows:

- A request to alter authorship must be made in writing from the corresponding author to the Editor-in-Chief, with a detailed explanation for the request, the nature of the changes, and the names and affiliations of all authors.
- Written approval of all authors named on the manuscript, as well as any individual(s) being added to the author list must be provided. The Publisher can provide a form for this, if needed.
- Upon receipt of the request and all written approvals of all involved parties, the Editor-in-Chief will consider the request, render a decision, and notify the corresponding author.
- Post-publication changes or alterations to conference abstracts are prohibited.

Author Disclosure Statements

Upon submission, authors are required to fully disclose any interests, funding or employment that may inappropriately influence or affect the integrity of the submission. Authors should disclose

- **Competing Interests.** A competing interest exists when an individual (or the individual's institution) has financial or personal relationships that may inappropriately influence his actions. These competing interests may be potential or actual, financial or other.
- **Personal/Financial Interests.** Stocks or shares in a company that may gain or lose financially from publication of the article; consulting fees or other remuneration from an organization that may gain or lose financially from publication of the article; patents or patent applications that are owned by or licensed to companies/institutions that may gain or lose value from publication of the article.
- **Funding.** Research support by organizations that may gain or lose financially from publication of the article. This support includes salary, equipment, supplies, honoraria, reimbursement or prepayment for attending symposia, and other expenses.
- **Employment.** Recent (within the past 5 years), current, or anticipated employment by an organization that may gain or lose financially from publication of the article.
- **Other Competing Interests.** Any personal relationship which may inappropriately affect the integrity of the research reported (by an author) or the objectivity of the review of the manuscript (by a reviewer or Editor), for example, competition between investigators, previous disagreements between investigators, or bias in professional judgment.

Affiliations

Authors should identify as their institution(s) the facility where the work was performed and executed. Changes in an author's affiliation after the work was completed, but prior to the submission or publication of the manuscript should be noted using a superscript asterisk in the author listing and a footnote on the title page indicating "Current Address" and listing the new affiliation. Corrections to affiliations or contact information due to relocation after publication is not permitted.

Permissions

When reproducing copyrighted material such as figures, tables, or excerpted text, the author(s) of the submitted paper must obtain permission from the original publisher or owner of material and submit it concurrently with the manuscript. The figure or table source must be listed in the reference list. With any copyrighted material, include a footnote with proper attribution (e.g. "Reprinted by permission from Jones et al.") and the appropriate reference. All permissions must be supplied at the time of submission. Authors are responsible for any fees that may be incurred by securing permission to reproduce or adapt material from other published sources.

Ethics

Institutional Review Board Approvals/Waivers

When reporting research involving human data, authors should indicate whether the procedures followed have been assessed by the responsible institutional and national review committee. If no formal ethics committee is available; authors should indicate if research was completed in accordance with the Declaration of Helsinki as revised in 2013. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. Approval by a responsible review committee does not preclude editors from forming their own judgment whether the conduct of the research was appropriate.

If the study is judged exempt from review, a statement from the committee is required. Informed consent by participants should always be secured. If not possible, an institutional review board must decide if this is ethically acceptable. This information should be outlined in the cover letter accompanying the submission, and a sentence declaring adherence should be included in the Materials and Methods section of the main text.

Ethics of Experimentation

See the following resources for studies involving human fetuses, fetal tissue, embryos, and embryonic cells:

- [NIH Grants Policy Statement](#)
- [National Conference of State Legislatures Embryonic and Fetal Research Laws](#)

Ethical Treatment of Animals

All peer-reviewed submissions containing animal experiments must comply with local and national regulatory principles and contain a statement in the **Materials and Methods** section of the main text stating whether national and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

Human Subjects: Patient Consent and Release

If applicable, it is incumbent upon the author(s) to obtain permission to reproduce any identifiable images of patients. Any identifying information should not be published in descriptions or photographs unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or patients' parent/guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be submitted. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the internet as well as in print after publication. Nonessential identifying details should be omitted. Informed consent should be obtained if there is any doubt that anonymity cannot be maintained. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are de-identified, the manuscript should contain assurances/statements that such changes do not distort scientific meaning.

In keeping with patients' rights of privacy, the Journal does not require the submission of patient consent forms, but instead requires the author(s) to retain and archive all patient consent documentation. Upon submission of a manuscript for review, the authors must make a statement in the cover letter to the Editor/Journal which attests that they have received and archived written patient consent in addition to providing the requisite statement in the manuscript.

Data Sharing

We recommend, but do not require, the sharing and archiving of data and any other artifacts that define and support the results stated in a manuscript in a suitable public repository (in accordance with valid privacy, legal, and ethical guidelines). We recommend that a data availability statement be included in the manuscript in the Methods section or as a separate section at the end of the main text file. Describe the location of the data, details on how it can be accessed and any licensing information. If the data is not publicly available or accessible, that information should also be provided.

Datasets should be cited in the reference list.

Important: Please check with your funding agencies to ensure that you are following their data sharing policies. If your funding agency has additional requirements exceeding our policy, you must follow the requirements of your funder.

Preprint Servers

Mary Ann Liebert, Inc., allows for papers that were previously deposited on preprint servers to be submitted to our journals, with the proviso that the author updates any preprint versions with a link to the final published article. All submissions, even those deposited on preprint servers, are subject to peer review and does not guarantee publication in any Mary Ann Liebert, Inc. journal.

The submitting author of a paper which was previously deposited to a preprint server should include a disclosure on the title page of the manuscript indicating the name and website of the server and include the DOI number of the preprint.

Referencing/citing non-peer-reviewed material that is found on any preprint server is generally discouraged by Mary Ann Liebert, Inc., journals, but if it is necessary, the citation must indicate that the content is not officially published in a journal, and can only be found on a preprint server.

Post-Publication Policies

Copyright

Published manuscripts for non-Open Access journals become the sole property of the Journal and will be copyrighted by Mary Ann Liebert, Inc. The author(s) explicitly assign(s) any copyrighted ownership in such manuscript to the Journal unless alternate arrangements are made prior to publication, including CC-BY licensing or if the Journal publishes under an Open Access model.

Upon acceptance, authors will receive a link to sign and complete the copyright transfer form (subject to exceptions listed above). Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement for not releasing the copyright.

Post Acceptance/Publication

All accepted manuscripts will go through copyediting, typesetting, figure sizing and placement, author proofing, corrections, revisions (from corrected proofs), online-ahead-of-print release, and lastly, issue assignment. Changes or alterations to a submission are not permitted after acceptance but should be addressed in page proofs.

Instant Online Publication (Just Accepted Program)

Journals in the Just Accepted program (formerly known as Instant Online) publish all accepted papers within 72 hours of receipt of all authors' signed copyright agreement forms in their unedited, uncorrected format on our Just Accepted platform.

The information that is published online, and in all indexing services, is pulled directly from the data that is populated into the fields in ScholarOne Manuscripts™ – NOT from the main text file – when the paper is originally uploaded to the system for peer review. Consequently, any errors contained in the system will remain on our website and all indexing services, including Medline, until the next revision* of the article is published. As such, it is critical that authors enter all authors' names correctly into the system at the time of submission. Any omissions or errors will remain on our website and in indexing services until the subsequent online version is published.

*The next revision will take place after the corresponding author reviews page proofs, makes any necessary corrections, and returns the changes to the Publisher. Once the alterations are completed, the revised version will be published on our website, and the newly corrected information will then be released to Medline/PubMed, in addition to any other indexing services in which the Journal is included.

Please note that the typical time between acceptance of a paper and page proof distribution is approximately 3-6 weeks depending on the length and complexity of the paper.

Journals participating in the Just Accepted program do not post any supplemental files/information until post acceptance steps are completed on the submission.

Page Proofs

Page proofs will be sent to the corresponding author as designated in ScholarOne™ when the manuscript was submitted. It is the corresponding author's

responsibility to share the page proofs with co-authors, if desired, and to coordinate all authors' corrections into one proof. The Publisher will not accept corrections from multiple authors/sources.

Author Response to the Galley Proof

The corresponding author is responsible for returning corrected galley proofs. Only corrections directly related to errors in typesetting and/or layout will be allowed. Any requested changes related to content, or that alter the outcome of a study, will require the approval of the Editor, and may require further peer review. If the corresponding author does not respond to page proofs, the manuscript may be delayed in the publication schedule, or published as-is, at the discretion of the Editor. If the corresponding author expects to be unavailable during the time the manuscript is in production, the publisher should be provided with an alternate contact.

Post Publication Corrections

In the event an error is discovered after publication of an article, the corresponding author should submit the correction in writing to the Journal Editorial Office for consideration. After Editor approval, alterations will be made to the online version of the article, and if the errors are significant, an official correction statement will be issued.

- Changes to author affiliations or contact details due to relocation after publication are not permitted.
- Corrections to meeting abstracts will be made only to the online version. The Journal does not issue formal correction statements to meeting abstracts, regardless of the nature of the correction.
- Correction Statements/Errata to published articles that require the reproduction of color figure(s) and/or table(s) may incur additional costs to the author(s).
- Requests for post-publication corrections to funding information will require institutional documentation showing that the funds were to be used for the published work.

Reprints

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany the proofs and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after the issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

Misconduct

Mary Ann Liebert, Inc., follows the guidelines and rules regarding scientific misconduct put forth by the Committee on Publication Ethics (COPE), the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), and the Office of Research Integrity (ORI).

Scientific misconduct and violation of publishing ethics vary and can be intentionally or unintentionally perpetrated. Some examples of misconduct and violations include, but are not limited to, the following

- **Scientific misconduct:** Fabrication, falsification, concealment, deceptive reporting, or misrepresentation of any data constitutes misconduct and/or fraud.
- **Authorship disputes:** Deliberate misrepresentation of a scientist's contribution to the published work, or purposefully omitting the contributions of a scientist.
- **Misappropriation of the ideas of others:** Improper use of scholarly exchange and activity may constitute fraud. Wholesale appropriation of such material constitutes misconduct.
- **Violation of generally accepted research practices:** Serious deviation from accepted practices in proposing or carrying out research, improper manipulation of experiments to obtain biased results, deceptive statistical or analytical manipulations, or improper reporting of results constitutes misconduct and/or fraud.
- **Material failure to comply with legislative and regulatory requirements affecting research:** Including but not limited to serious or substantial, repeated, willful violations of applicable local regulations and law involving the use of funds, care of animals, human subjects, investigational drugs, recombinant products, new devices, or radioactive, biologic, or chemical materials constitutes misconduct.
- **Conflict of Interest:** Nondisclosure of any direct or indirect conflicts to the Journal, which prevents you from being unbiased, constitutes misconduct.
- **Misrepresentation: Deliberate misrepresentation** of qualifications, experience, or research accomplishments to advance a research program, to obtain external funding, or for other professional advancement constitutes misconduct and/or fraud.
- **Plagiarism:** Purposely claiming another's work or idea as your own constitutes misconduct and/or fraud.
- **Simultaneous Submission:** Submitting a paper to more than one publication at the same time constitutes misconduct.
- **Peer Review Fraud:** Individuals who knowingly commit peer review fraud or violate the standard accepted practices of peer review will be reported to their institutions.

Publisher's Response to Allegations of Scientific Misconduct

The Publisher is committed to helping protect the integrity of the public scientific record by sharing reasonable concerns with authorities who are in the position to conduct an appropriate investigation into any allegation. As such, all allegations of misconduct will be referred to the Editor-in-Chief of the Journal who in turn will review the circumstances, possibly in consultation with Associate Editors and/or members of the Editorial Board. Initial fact-finding will usually include a request to all the involved parties to state their case and explain the circumstances in writing. In questions of research misconduct centering on methods or technical issues, the Editor-in-Chief may confidentially consult experts who are blinded to the identity of the individuals, or an outside expert. The Editor-in-Chief will determine if there is enough reasonable evidence that misconduct possibly occurred. Some instances may require the Editor and/or Publisher to report the instance to the authors' institution for arbitration and/or investigation. The Editor and Publisher will follow the institutions' findings for resolution.

When allegations concern conflict between authors, the peer review or publication process for the manuscript in question will cease while the process described herein is researched. In the case of allegations against reviewers or editors, they will be substituted in the review process while the matter is investigated.

Editors or reviewers who are found to have engaged in scientific misconduct will be removed from further association with the Journal and reported to their institution(s).

If an inquiry concludes there is a reasonable possibility of misconduct, the Editor-in-Chief will retract the paper from the Journal and the scientific record. If the paper is still under peer review, the Editor-in-Chief will withdraw the paper from consideration to the Journal. If the inquiry leads to a lengthy investigation, the Journal will issue an interim Expression of Concern which will identify the concern for readers until a resolution is reached.

Every attempt will be made to keep all allegations confidential.

Retractions**

The journal and its publisher are committed to upholding the proper protocols and established standards of peer review. Published papers found to be in violation of the accepted standard principles of peer review and scientific publishing will be officially retracted from the literature. An official retraction notice explaining in full detail the need for a retraction will be published.

**Any fees collected for an article that is subsequently retracted are non-refundable.

Press Embargo

Mary Ann Liebert, Inc., permits the use of accepted pre-published manuscripts for the sole purpose of pitching to news organizations under strict embargo, and with the approval of and expressed collaboration with the publisher. A watermarked PDF version of the article (not a Word document or any other editable version) may be shared only with named, personal contacts at trusted news sources upon request. News sources must be informed upon delivery of the PDF that the manuscript is for reference-only purposes and can be used only in preparation of their news coverage of the article. It is strictly prohibited to publicly share, post, or otherwise distribute the PDF in any media format. Upon official publication of the article, news organizations must link directly to the published article on the Publisher's Journal website. To coordinate publication timing and press efforts, please contact the [Director of Marketing](#).

Self-Archiving

Three versions of the article format are referenced in the policy guidelines below:

- **Original Submission:** The article version that is submitted by the author for consideration, before peer review.
- **Accepted Version:** The article version that has been formally accepted after peer review, prior to any typesetting for the journal. This is the version accepted by the Editor, before proofs, corrections, and typesetting. Also known as the "raw" accepted version of a manuscript.
- **Article of Record:** This article version is the "version of record" that has been formally copyedited, typeset, and published online ahead of print and/or in a journal issue. It is the same version published in the "Online Now" section of the Journal website.

Self-Archiving Policy

Mary Ann Liebert, Inc., publishers offer authors many options and opportunities to self-archive their work.

• Subscription/Hybrid Journals

	Embargo	Personal Website	Institutional Repository or Company Website	Preprint Server	Other Repository
Original Submission	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Accepted Version	Personal Website: No Institutional or Other Repository: 12 months post-publication *No embargo if Open Access is purchased	Yes	Yes	No	Yes
Article of Record	Yes	With Open Access license or publisher permission only	With Open Access license or publisher permission only	No	With Open Access license or by funder requirement

• Open Access Journals

	Embargo	Personal Website	Institutional Repository or Company Website	Preprint Server	Other Repository
Original Submission	No	No	Yes	Yes	Yes
Accepted Version	No	Yes	Yes	No	Yes
Article of Record	Yes	Yes	Yes	No	Yes

Learn more about [publishing your work Open Access here](#).

Mary Ann Liebert, Inc., publishers' society partners or associated affiliates may set self-archiving policies independently, outside of the general policies mentioned below. Authors should refer to the copyright policy of their chosen journal, or by contacting the specific journal editorial office directly. In addition, specific funding organizations have separate agreements and authors should refer to the policies of those specific funding agencies prior to the submission of their manuscript.

If your submission is formally accepted after peer review in one of our journals, authors must include an acknowledgement of acceptance for publication on all archive sites and, following online publication, authors must include the following notice on the first page:

This is the original submission version (pre-peer review) of the following article: [full citation], which has now been formally published in final form at [journal title] at [link to final article using the DOI]. This original submission version of the article may be used for non-commercial purposes in accordance with the Mary Ann Liebert, Inc., publishers' Self-Archiving Terms and Conditions.

The original submission version posted may never be updated or replaced with the article of record version unless the author chooses to publish their paper Open Access under any of the Creative Commons Licenses available through the Publisher. If you are interested in publishing your work Open Access, please feel free to review our [Open Access Policies and Licenses](#) or [contact us](#).

Other Terms and Conditions

Authors may use either the original submission or accepted version for curricular or teaching purposes, dissertations, theses, or books, provided that all posted versions include the aforementioned policies, and follow all guidelines and requirements specified. Additionally, authors may share original submission or accepted versions with researchers and research colleagues provided that such sharing is not for commercial purposes.

The self-archived submitted and accepted versions may only be used in non-commercial capacities. Individual users may view, print, download, and copy self-archived articles, as well as text and data mine the content conditions for non-commercial and non-promotional research and private study purposes, under the following requirements

- The authors' moral rights are not compromised and there is clear "attribution" of the author(s) in the shared work.
- The authors' integrity remains intact; the work should never be altered in such a way that the author's reputation may be damaged.

- Any reuse complies with the copyright policies of the owner of that content.
- Self-archived content may never be republished verbatim in whole or in part in print or online formats.

U.S. Sanctioned Countries

The Office of Foreign Assets Control (OFAC) of the US Department of the Treasury administers and enforces economic and trade sanctions based on US foreign policy and national security goals against targeted foreign countries and regimes, terrorists, international narcotics traffickers, those engaged in activities related to the proliferation of weapons of mass destruction, and other threats to the national security, foreign policy or economy of the United States. (Source: [Office of Foreign Assets Control – Sanctions Program and Information](#))

Our journal Editors welcome contributions from researchers around the world; however, they are also required to follow sanction laws and regulations. As of August 2020, sanction measures imposed by the United States, United Nations, European Union, and Australia are currently in place against the following countries: **Cuba, Crimea, Iran, North Korea, and Syria**. Journal editors will treat with caution any submission from a sanctioned country regarding the subject matter and will seek appropriate legal advice from the publisher if necessary.

Papers from sanctioned countries that are submitted to any Mary Ann Liebert, Inc., journal **MUST** contain a confirmation statement after the conclusion section of the manuscript which indicates that EACH listed author confirms that their research is supported by an institution that is primarily involved in education or research.

For further questions, please contact our [Director of Production and Editorial Operations](#).

Archiving and Preservation

Mary Ann Liebert, Inc., deposits and archives all publications in [Portico](#) for long-term digital preservation. Your article will be easily searchable on Google, Google Scholar, and other search engines.

Publisher Information

Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 140 Huguenot Street, 3rd Floor, New Rochelle, NY 10801; Tel: 914-740-2100; Email: info@liebertpub.com;
Website: liebertpub.com

ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO


ACESSO RESTRITO

(/sucupira/portais/menu_portal.jsf)

INÍCIO (/SUCUPIRA/PUBLIC/INDEX.JSF) >> Qualis >> Qualis Periódicos

Qualis Periódicos



* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016 ▾

Área de Avaliação:

-- SELECIONE -- ▾ +

ISSN:

Título:

Classificação:

-- SELECIONE -- ▾

Consultar

Cancelar

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	ADMINISTRAÇÃO PÚBLICA E DE EMPRESAS, CIÊNCIAS CONTÁBEIS E TURISMO	A2
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	BIOTECNOLOGIA	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	BIOTECNOLOGIA	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIA DE ALIMENTOS	A2

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIA DE ALIMENTOS	A2
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS AGRÁRIAS I	A2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS AGRÁRIAS I	A2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS AMBIENTAIS	A2
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	B2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	B2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III	B2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	FARMÁCIA	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	MEDICINA I	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	MEDICINA II	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	MEDICINA VETERINÁRIA	A2
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	MEDICINA VETERINÁRIA	A2
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	NUTRIÇÃO	B1
1556-7125	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	ODONTOLOGIA	B1
1535-3141	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	SAÚDE COLETIVA	A2

